UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences pharmaceutiques

Année 1974 - Thèse N° 677

Recherches physiologiques et chimiques sur le pigment bleu du Champignon *Corticium caeruleum* (Schrad. ex Fr.) Fr. (Aphyllophorales)

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement
le Mercredi 26 Juin 1974

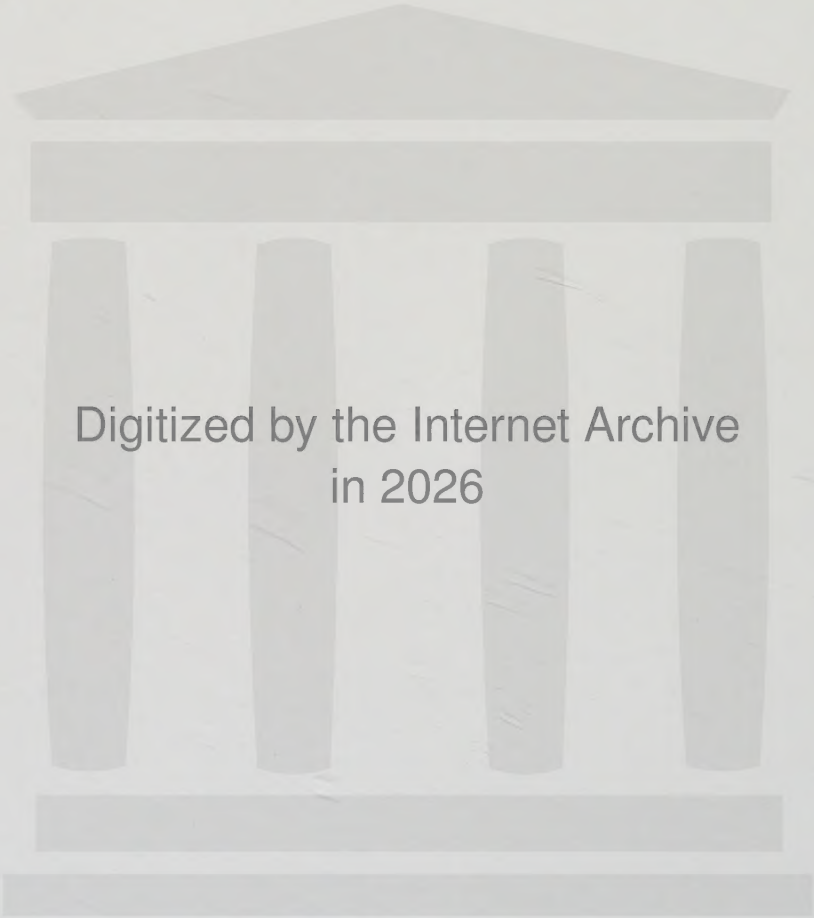
par Arlette NEVEU
née le 3 Février 1935 à DEVILLE-LES-ROUEN (Seine-Maritime)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Président

M. R. BAUTE, Professeur . . . . . } Juges
M. J.-C. COLLETER, Professeur . . . . . }
M. E. NEUZIL, Professeur . . . . . }

Éditions Bergeret, 71, rue Leyteire - 33000 BORDEAUX
— Tél. (56) 91.12.59 —


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547319_0037

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences pharmaceutiques

Année 1974 - Thèse N° 677

Recherches physiologiques et chimiques sur le pigment bleu du Champignon *Corticium caeruleum* (Schrad. ex Fr.) Fr. (Aphyllophorales)

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement
le Mercredi 26 Juin 1974

par Arlette NEVEU
née le 3 Février 1935 à DEVILLE-LES-ROUEN (Seine-Maritime)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Président

M. R. BAUTE, Professeur . . . . . }
M. J.-C. COLLETER, Professeur . . . . . } Juges
M. E. NEUZIL, Professeur . . . . . }

Éditions Bergeret, 71, rue Leyteire - 33000 BORDEAUX
— Tél. (56) 91.12.59 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Avant d'exposer, les résultats de notre travail nous voudrions exprimer notre reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidée au cours de sa réalisation.

Le fait que Monsieur le Professeur MASQUELIER ait accepté de présider le jury de notre thèse suffirait à motiver notre gratitude à son égard ; mais celle-ci trouve une justification encore plus profonde dans la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée, nous donnant largement accès à l'équipement du Laboratoire de Matière médicale et nous faisant bénéficier de ses connaissances phytochimiques, notamment dans le domaine des pigments végétaux.

Monsieur le Professeur BAUTE nous a confié notre sujet de thèse et tout au long de nos recherches, qu'il a dirigées pas à pas, il nous a fait profiter de son expérience. Il a constamment veillé au déroulement et à la bonne marche de ce travail, qui s'inscrit dans la spécialisation de Phytochimie fongique donnée par lui au Laboratoire de Cryptogamie et Microbiologie industrielle. Nous tenons à lui dire ici notre très vive gratitude.

Grâce à Monsieur le Professeur COLLETER, qui nous a donné de précieux conseils pour la partie chimique de ce travail, une collaboration s'est désormais établie avec le Laboratoire de Chimie analytique. En acceptant de siéger parmi les membres du jury, il a témoigné tout son intérêt pour ces recherches. Nous l'en remercions vivement.

Monsieur le Professeur NEUZIL, Professeur de Biochimie médicale B, a lui-même effectué des recherches sur des pigments naturels ; il s'est intéressé à nos travaux, nous a prodigué ses conseils et a bien voulu siéger dans le jury de notre thèse. Nous lui en sommes très reconnaissante.

Monsieur MICHAUD, Maître de Conférences de Matière médicale, a accepté de relire ce travail, après nous avoir aidée de ses avis ; qu'il en soit remercié.

Plusieurs membres de l'équipe de recherche à laquelle nous appartenons travaillent sur d'autres aspects de la chimie de *Corticium cæruleum*. Nous exprimerons notre gratitude en tout premier lieu à Madame BAUTE , Maître-Assistant au Laboratoire de Cryptogamie et Microbiologie industrielle, qui nous a prodigué son appui et témoigné son amitié tout au long de ces travaux. Merci également à Monsieur DEFFIEUX et à Mademoiselle FILLEAU, Maître-Assistant et Assistant au Laboratoire de Chimie Analytique, pour l'aide qu'il nous ont apportée.

Monsieur BOURGEOIS, Ingénieur au C.N.R.S., a réalisé pour nous les spectres de masse au Laboratoire de Chimie appliquée (Professeur LALANDE) de l'Université de Bordeaux I. Il nous a fait bénéficier de ses connaissances en ce domaine ; qu'il en soit vivement remercié.

Monsieur le Professeur EYME, Professeur de Botanique à l'Université de Bordeaux I, nous a apporté l'aide de son Laboratoire pour les photographies de microscopie électronique. Nous lui exprimons notre gratitude.

C'est Monsieur le Professeur LAUBIE, Professeur de Botanique et Cryptogamie, qui a isolé la souche de *Corticium cæruleum* sur laquelle ont porté nos recherches. Nous l'en remercions.

Nous aurons garde de ne point oublier Monsieur le Professeur GADRET et Monsieur le Professeur GOURSOLLE , qui nous ont offert leur appui en diverses circonstances, notamment pour la polarographie. Messieurs SORIANO, LABOUYRIE, DORLET et FONDEVILLE nous ont apporté leur aide tout au long de ces recherches. Enfin, nous avons toujours trouvé le meilleur accueil auprès des membres du Laboratoire de Chimie analytique et de celui de Matière médicale. Que tous en soient vivement remerciés.

*
* *

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES ET CHIMIQUES SUR LE PIGMENT BLEU DU CHAMPIGNON *CORTICIUM CAERULEUM* (Schrad. ex Fr.) Fr. (APHYLLOPHORALES)

*

Parmi la multitude des composés chimiques élaborés par les Champignons, les pigments ne peuvent manquer de susciter l'intérêt du chercheur. Presque toutes les espèces fongiques, en effet, sont colorées, certaines intensément ; tel est le cas de *Corticium caeruleum*, dont le mycélium lignicole, d'un bleu profond, attire parfois l'attention.

La rareté des travaux portant sur ce Champignon nous a incitée à en entreprendre l'étude.

Les pages qui suivent exposent nos recherches et les résultats auxquels elles ont abouti.

H I S T O R I Q U E

I - LES PIGMENTS FONGIQUES.

Il y a une trentaine d'années déjà, PASTAC (1942), dressant une liste des "matières colorantes des Champignons", ne recensait guère plus de trente pigments fongiques, et la nature chimique de certains d'entre eux n'était pas encore parfaitement connue. En 1946, SANNIE, faisant le point à son tour, ajoutait une trentaine de pigments à ceux signalés par PASTAC, puis SMITH (G.) (1954) complétait les listes antérieures ; par la suite, divers ouvrages de chimie fongique ou microbienne énumèrent un grand nombre de pigments (MILLER, 1961 ; SHIBATA, NATORI et UDAGAWA, 1964 ; GOODWIN, 1965 ; TURNER, 1971).

Sans vouloir dresser une liste intégrale des pigments fongiques, qui ferait double emploi avec les ouvrages ci-dessus, nous citerons quelques exemples de travaux concernant des genres de la classification particulièrement connus.

Dans le genre *Aspergillus*, un certain nombre de pigments ont été identifiés : GOULD et RAISTRICK (1934) isolent de différentes espèces du groupe *glaucus* la flavoglaucine et l'auroglaucine, qui se retrouvent notamment chez *A. repens*, *A. amstelodami*, *A. niveoglaucus*, *A. chevalieri*, *A. pseudoglaucus*, *A. echinulatus*, *A. ruber* et *A. umbrosus*. GALMARINI et STODOLA (1965) étudient la fonsécine, pigment d'un mutant de *A. fonsecaeus*. HAMASAKI et coll. (1965) identifient des pigments de nature anthraquinonique, les

versicolorines A et B, chez *A.versicolor*. Pour ce même *A.versicolor*, également étudié par RAMAUT (1965), ROBERTS et ROFFEY (1965) indiquent l'existence d'un autre pigment anthraquinonique, l'avérythrine.

En ce qui concerne le genre *Penicillium*, on peut citer les travaux de STODOLA, RAPER et FENNEL (1951) qui isolent les pigments de *P.herquei*, ceux de KIKUCHI (1961) puis de SHIBATA et coll. (1968) et de UENO et coll. (1968) à propos de la formation de lutéoskyrine par *P.islandicum*. BU'LOCK et SMITH (J.R.) (1968) retrouvent chez ce même *P.islandicum* deux dérivés hydrogénés de la caténarine (substance signalée dès 1933 par CHARLES et coll. chez *Helminthosporium catenarium* et par SHIBATA et coll. en 1953 chez *A.amstelodami*).

Les autres genres n'ont pas été négligés non plus par les chercheurs et sans vouloir, là encore, les énumérer tous, on peut mentionner quelques exemples :

Des auteurs japonais, FUJISE, HISHIDA et coll. (1961) indiquent une formule pour la fusaroskyrine, isolée d'une espèce de *Fusarium*. MORISHITA et coll. (1968) établissent la structure de l'aurofusarine de *F.culmorum* et le mécanisme de sa biosynthèse à partir de la rubrofusarine, également présente chez ce même Champignon.

Dans le groupe des Dermatophytes, ITO, FUJI et coll. (1965) étudient par des méthodes chromatographiques des pigments isolés de certaines espèces de *Trichophyton*.

MEISSNER et DELBRUCK (1968) analysent les carotènes présents chez trois mutants du genre *Phycomyces*.

Chez les Macromycètes les domaines d'exploration ne manquent pas non plus.

Rappelons, entre autres, à titre d'exemple, les travaux de BERTRAND (1901 et 1902) sur le bolétol (1) de *Boletus satanas*, de KÖGL et POSTOWSKY (1925) sur l'émodine de *Cortinarius sanguineus*, de KÖGL et ERXLEBEN (1930) sur la muscarufine d' *Amanita muscaria*, et plus récemment, ceux

(1) *Précurseur supposé d'une "bolétoquinone" bleue. Des travaux récents (BEAUMONT et coll.,1968 ; STEGLICH et coll., 1968) rejettent l'existence de ces composés et attribuent le bleuissement observé chez certains Bolets à la présence d'*acide variégatique, *qui fait partie de la famille des acides tétroniques.*

de GABRIEL (1960) sur les Bolets et les Cortinaires, ceux de GLUCHOFF et LEBRETON (1970) sur la structure de la russularhodine, pigment rouge des Russules. Des pigments caroténoïdes sont présents chez plusieurs Discomycètes.

Le genre *Corticium* n'a pas échappé à ces investigations sur les pigments fongiques, nous y reviendrons plus loin.

Ces pigments fongiques se répartissent dans les grands groupes chimiques suivants :

a) Pigments caroténoïdes

b) Pigments quinoniques : dérivés de la benzoquinone, de l'anthraquinone, de la naphtoquinone, de la phénan - thrène-quinone.

c) Pigments dérivés des phénols.

d) Pigments hétérocycliques.

e) Pigments dérivés des azulènes.

II- LES FACTEURS DE LA PIGMENTOGENESE CHEZ LES CHAMPIGNONS.

1- Parmi les différents facteurs de la pigmentogenèse, *les facteurs nutritionnels* ont fait l'objet de plusieurs travaux.

JOHNSON et GOULD (1953) parviennent à inhiber la production de pigment chez certains *Aspergillus* du groupe *glaucus* par l'acide iodo-acétique et le fluorure de sodium.

ZUSSMAN et VICHER (1961) ont recherché quel pouvait être le rôle de la nutrition et de l'environnement vis-à-vis de la pigmentation de *Trichophyton rubrum*. La formation de pigment a été étudiée en cultures aériennes et submergées. La présence d'oxygène est nécessaire. En plus d'un hydrate de carbone convenable, le Champignon a besoin pour pigmenter de certains amino-acides, en particulier de la phénylalanine ou de la tyrosine.

RAMAUT (1961) a observé le comportement d'*Aspergillus versicolor* sur milieu de CZAPEK-DOX renfermant ou non du magnésium, et a noté des modifications du pouvoir de synthèse du Champignon.

CHOLLET (1964) souligne l'influence du sucre fourni, de sa quantité et de la source azotée sur l'apparition des pigments benzoquinoniques et anthraquinoniques d'*Aspergillus mangini*.

BAUTE (1964), étudiant une souche d'*Epicoccum nigrum*, a pu mettre en évidence le rôle du pH sur la pigmentogenèse (pH variable selon les sources de carbone ou d'azote utilisées) et l'influence directe, sans intervention du pH, de l'éthanol, du rhamnose et de quatre poly-alcools qui induisent la production d'un groupe de pigments jaunes, alors que le pigment "normal" de la souche est rouge.

CARLEY et coll. (1967) obtiennent une inhibition de la pigmentogenèse avec *Aspergillus niger* par l'action du diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.).

UENO (1967) a fait des recherches sur l'action plus particulière de la biotine dans la biosynthèse d'un pigment anthraquinonique chez *Penicillium islandicum*.

JOHNSON et WHITE (1969) ont noté que la production de pigment par *Helminthosporium oryzae* dépend du milieu de culture, un milieu synthétique, type Czapek, donnant de meilleurs résultats que des milieux complexes renfermant de la caséine, de la peptone ou de la liqueur de corn-steep.

TIMMER et coll. (1970) ont observé que la présence de glucose inhibait fortement la production de pigment chez des espèces du genre *Phytophtora*.

L'influence de l'aération des cultures a, en outre, été signalée par divers auteurs : JOHNSON et GOULD (1953) pour des *Aspergillus* du groupe *glaucus*, CHOLLET (1964) pour *Aspergillus mangini*, CARBONE et JOHNSON (1964) pour *Aspergillus umbrosus*.

2 - L'influence de la lumière.

Les effets de la lumière sur la croissance et la pigmentogenèse d'un certain nombre d'espèces fongiques ont

été étudiés. Ces recherches portent essentiellement sur les rayonnements situés dans le visible ou l'ultra-violet.

Dès 1936, SMITH (E.C.) passe en revue les travaux de plusieurs auteurs portant sur l'action de la lumière visible et de l'ultra-violet sur la pigmentogenèse, la croissance et la formation des appareils reproducteurs chez des espèces appartenant aux genres : *Pyronema, Fusarium, Claviceps, (Claviceps purpurea) Mucor, Phycomyces ;* parmi eux il cite BESSEY (1904), MILBURN (1904), KOSAROFF (1907), ROBINSON (1914), MORRIS (1923).

Plus récemment BJORNSSON (1959) a observé l'influence de l'intensité et de la longueur d'onde de la lumière sur d'autres Champignons des genres *Trichoderma, Stemphylium, Botrytis, Penicillium,* etc. Cette action se manifeste à l'égard principalement de la formation des sclérotes et de la sporulation.

LEACH (1962) a étudié les effets du proche ultra-violet sur la sporulation d'une trentaine de Champignons parmi lesquels figure le genre *Alternaria*. Celle-ci est induite ou accrue par l'action d'un rayonnement de longueur d'onde de 130 à 400 nm pendant plusieurs jours.

Dans une étude du même ordre sur quelques *Helminthosporium,* BABU SINGH YADAV (1963) a obtenu des résultats concernant la sporulation avec l'ultra-violet et également avec des radiations situées dans le visible.

Outre ses effets sur le développement, la lumière agit aussi sur la production de pigments chez les Champignons. L'influence de la lumière visible ne semble obéir à aucune règle générale.

Elle a parfois un rôle inhibiteur : BRANDT (1964) remarque que chez certains *Verticillium* elle supprime ou diminue la production de mélanine.

Il en est de même, d'après les travaux de ZUSSMAN et coll. (1961) avec *Trichophyton rubrum* chez qui la lumière solaire inhibe le développement et la pigmentation lors d'une exposition directe de plusieurs heures par jour. Il n'en va pas de même avec un éclairement moins intense.

D'autre part, l'incubation en étuves obscures n'empêche pas de nombreuses espèces d'élaborer des pigments variés ayant pour localisation tantôt les spores, tantôt le mycélium, ou encore diffusant dans le milieu de culture.

C'est ainsi, par exemple, que dans le groupe des Aspergillacées de nombreux *Aspergillus et Penicillium* ont une pigmentation normale à l'obscurité. On peut citer *A. niger* dont les spores sont noires à maturité, *A.flavus* dont les colonies ont une teinte (due aux spores) allant du jaune au vert, *A.repens* qui laisse diffuser dans le milieu un pigment jaune fluorescent tandis que *P.raistrickii* produit un pigment rouge qui diffuse également dans le milieu, etc...

Certains *Fusarium* continuent à produire à l'obscurité de la rubrofusarine qui donne au mycélium une teinte rouge.

On pourrait ainsi multiplier les exemples.

En revanche,la lumière exerce parfois une action positive dans l'exaltation ou même l'apparition des pigments de certains Champignons.

Parmi les auteurs ayant effectué des observations précises sur des espèces filamenteuses on peut citer :

- SMITH (E.F.) et SWINGLE (1904) pour l'étude de *Fusarium oxysporum*. Ces auteurs ont observé que les cultures du Champignon effectuées à l'obscurité étaient très pâles en comparaison de la coloration présentée par celles qui s'étaient développées à la lumière.

- Ce même genre *Fusarium* a fait l'objet d'autres travaux parmi lesquels ceux de BINDL et coll. (1970) avec *F.aquaeductum* chez qui la synthèse des caroténoides (ε carotène, γ carotène, torulène, neurosporaxanthine, etc). est dépendante de la lumière, et ceux de THEIMER et RAU (1970) qui ont montré que cet effet inducteur de la lumière pouvait être supprimé par un réducteur (dithionite, hydroxylamine) ou obtenu également par le peroxyde d'hydrogène.

- CHOLLET (1964) mentionne la lumière comme facteur favorisant la pigmentogenèse *d'Aspergillus mangini*.

- MUNTANJOLA-CVETKOVIC (1965) a étudié des espèces du genre *Aspergillus* telles que *A.clavatus, A.versicolor et A. niger*. *A.clavatus* est plus jaunâtre à la lumière par production d'une plus grande quantité de carotènes, tandis que les spores vertes d'*A.versicolor* et brun-foncé

d'*A.niger* sont plus claires pour les cultures à la lumière que pour celles effectuées à l'obscurité.

- ZALOKAR (1954) a effectué des recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez *Neurospora crassa*.

La pigmentogenèse de cultures submergées dans un milieu liquide contenant du Tween 80 ne s'observe qu'après exposition à l'air et à la lumière. Un éclairement bref (de l'ordre de 1 nm) stimule la production de pigment mais il faut que la quantité d'oxgène fournie soit suffisante.

- RAU et coll. (1968) travaillant dans le même sens ont comparé pour cette biosynthèse les résultats obtenus pour *N.crassa* et ceux observés avec *Fusarium*. Les deux mécanismes de photoinduction sont très semblables et, d'autre part, on peut noter une action inhibitrice de l'actidione (cycloheximide).

III- LES TRAVAUX SUR LES CORTICIUM.

Avant d'exposer ces travaux, il est utile de donner quelques précisions sur la systématique des *Corticium*.

1°) Le genre Corticium Fries.

Les *Corticium* sont des Autobasidiomycètes (basides non cloisonnées) appartenant à l'ordre des Aphyllophorales (développement hyménial toujours gymnocarpique : l'hyménium toujours nu, a une croissance indéfinie), et à la famille des Corticiacées. Celle-ci est l'une des cinq ou six familles que l'on distingue classiquement dans l'ordre des Aphyllophorales (les autres sont les Clavariacées, les Polyporacées, les Hydnacées et les Cantharellacées, auxquelles certains adjoignent les Cyphellacées).

Les Corticiacées (1) groupent des espèces le plus souvent lignicoles, dont l'hyménium est typiquement lisse mais parfois plus ou moins bosselé. La forme du réceptable, variable, est utilisée par certains auteurs comme critère de subdivision de la famille en deux tribus ; c'est ce que fait VIENNOT-BOURGIN (in MAUBLANC, 1959) dont nous adopterons la classification :

1) *Certains auteurs (BOIDIN, 1968 ; HEIM, 1957) emploient les termes de "Corticiés" ou de "Corticinés" plutôt que Corticiacées.*

- les Stérées (avec les genres *Stereum et Hymenochaete*) dont le réceptacle fructifère est bien différencié et rappelle celui de certaines Polyporacées.
- les Corticiées (considérées comme le groupe le plus inférieur), dont le réceptacle est simplement formé d'une croûte mince, coriace ou plus ou moins floconneuse, étalée sur les bois morts auxquels elle adhère totalement, sauf chez quelques espèces dont les bords tendent à se relever.

Les deux principaux genres de la tribu des Corticiées sont *Corticium* Fries et *Peniophora* Cooke, qui s'opposent par les cystides, nulles ou à peine différenciées chez les *Corticium*, très différenciées au contraire chez les *Peniophora*.

On peut y ranger aussi *Odontia* Fr. et *Radulum* Fr.

HEIM (1957), à côté de ce qu'il appelle les Corticiés vrais, à réceptacle étalé et à hyménium lisse, place les Théléphores, avec le genre *Thelophora*, à réceptacle ramifié et à hyménium ridé ou granulé.

2°) *Les principales espèces de Corticium.*

Les espèces de *Corticium* sont nombreuses. AINSWORTH et BISBY, dans leur "Dictionnary of the Fungi" (1966), en signalent cent cinquante. En outre, les noms de genres aussi bien que les noms d'espèces ont donné lieu à de très nombreuses synonymies, ce qui complique singulièrement la tâche du lecteur désireux de confronter un certain nombre d'ouvrages (1). Nous nous limiterons ici aux espèces qui ont été mentionnées en raison de propriétés particulières.

a) Propriétés phytopathogènes.

Corticium solani (= C.vagum) est la forme parfaite de *Rhizoctonia solani*, pathogène vis-à-vis de la Pomme de terre sous forme d'un mycélium stérile ; la présen-

(1) *Rappelons que l'unanimité est loin de régner parmi les systématiciens. On en aura une idée en consultant MOREAU F. (1952), HEIM (1957), BESSEY (1965) et surtout BOIDIN (1968).*

ce de basides sur ce mycélium a permis de rattacher l'espèce au genre *Corticium* et, plus récemment, au genre *Pellicularia*, genre séparé de *Corticium* par ROGERS (1943). C'est l'agent du "rhizoctone noir", encore appelé "variole" ou "maladie des manchettes". Le Champignon attaque les stolons et les radicelles lorsque ceux-ci sont encore enterrés. Des taches brunes apparaissent sur les organes parasités précédant leur décomposition. Il peut également former une collerette (ou manchette) mycélienne à la base des tiges aériennes.

Corticium (= *Pellicularia*) *koleroga* provoque une affection des plants de caféier. Les feuilles se dessèchent et se détachent mais restent retenues aux rameaux par des fils très fins (MOREAU, 1952).

Une aptitude phytopathogène se rencontre aussi chez *C.salmonicolor* vis-à-vis des plants de Cacao, *C.gramineum* pour certaines espèces de Graminées, *C.sasakii* pour le Riz.

Certains Champignons symbiotes d'Orchidées ont pu être identifiés à des *Corticium* (SPRAU, 1937 in MOREAU F., 1952).

b) Particularités chimiques.

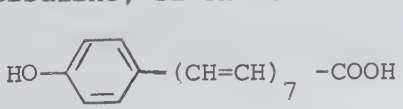
C.violaceo-lividum produit des essences de nature mal définie (LUTZ, 1948).

Plusieurs espèces sont connues pour la production d'enzymes. *C.centrifugum* produit une amylase, une galactosidase, de la tyrosinase.

Divers pigments ont été isolés de certains *Corticium*. C'est ainsi qu'en 1948 ERDTMAN a isolé du mycélium de *C.croceum* (= *C.sulphureum*) un pigment jaune, la corticrocine, dont les travaux de WEEDON 1954) puis de SHOW et WHITING (1954) ont permis d'établir la formule :

$$HOOC-(CH=CH)_6-COOH$$

De son côté, GRIPENBERG (1952) obtient un autre pigment, la cortisaline, il en établit la formule :



La cortisaline se présente sous forme d'aiguilles violet-rouge. MARSHALL et WHITING en réalisent la synthèse en 1957.

A partir de *Peniophora sanguinea* (1), qui produit de la xylérythrine, GRIPENBERG et MARTIKKALA (1970) mettent en évidence un autre pigment, la péniophorine ($C_{26}H_{16}O_6$). Ce pigment possède un atome d'oxygène de plus que la xylérythrine, c'est un dérivé trihydroxylé du triphényl-3,4,7 benzofuranne dione-2,6. La même année (1970) GRIPENBERG isole, toujours de *P.sanguinea*, la péniophorinine ($C_{27}H_{16}O_6$) qui possède un atome de carbone de plus que la péniophorine.

c) Nutrition.

GONDO, ARIMURA et coll. (1969) ont étudié le rôle de la thiamine et du saccharose sur *C.rolfsii*.

ODDOUX (1957) dans le cadre de ses recherches sur les exigences alimentaires des Homobasidiés a noté les conditions d'utilisation de divers sucres et polyols par *C.flavescens* ; les meilleurs résultats sont obtenus avec le glucose, le xylose, le mannose, l'arabinose. En ce qui concerne les facteurs de croissance, *C. flavescens* est auxotrophe vis-à-vis de la thiamine et de ses constituants.

COCHRANE (1958) mentionne la possibilité de certaines espèces du genre *Corticium* d'utiliser la cellulose et remarque que chez *C.centrifugum* une déficience en thiamine augmente la production d'acide oxalique.

3°) L'espèce *Corticium caeruleum* (Schrad.ex Fr.) Fr.

BOURDOT et GALZIN (1927) ont subdivisé le genre *Corticium* en de nombreuses sections sous-génériques en se basant plus spécialement sur la constitution et la consistance de la trame mycélienne. *C.caeruleum* appartient à l'une de ces sections, la section *Membranacea*, et BOIDIN (1968) le conserve à cette place.

C.caeruleum croît sur l'écorce des morceaux de bois morts, dans les endroits assez humides et suffisamment ombragés (sous-bois). On le trouve aussi toute

(1) *Rappelons que le genre* Peniophora *est voisin du genre* Corticium.

l'année dans les haies et sur les vieux rameaux morts (HEIM, 1957).

Il est reconnaissable à sa couleur bleu foncé qui présente une zone plus claire, souvent blanche, en bordure des colonies.

Examiné au microscope, le mycélium présente des hyphes de diamètre régulier [1,5 à 4 µm x 3,2 µm (BOIDIN)] constituées de nombreux articles de longueur sensiblement égale, portant en outre de nombreuses boucles.

Les hyphes jeunes, nouvellement formées, sont entièrement blanches. Les hyphes plus âgées montrent un pigment bleu, localisé au niveau de la paroi.

Peu d'auteurs se sont intéressés juqu'à présent à cette espèce, comme ont permis de le confirmer nos recherches bibliographiques qui ont donné peu de résultats.

Nous avons pu consulter surtout les travaux d'ODDOUX (1957), et ceux de BOIDIN, déjà cité à plusieurs reprises. F. MOREAU (1952) fait état des observations de MOSLISCH sur la phosphorescence à l'obscurité d'*Auricularia phosphorea* (= *C. caeruleum*) que nous n'avons pas observées avec la souche étudiée ici.

BOIDIN a réussi à obtenir la sporée et a pu réaliser une étude de la germination des spores. Il a également donné une description du Champignon observé au microscope et a recherché les enzymes produites par cette espèce. Cette étude biochimique a révélé la présence de tyrosinase (recherchée sur milieu au malt et à la tyrosine) et d'une phénol-oxydase donnant une réaction moyenne avec le p. crésol. Ces travaux étaient effectués sur les souches 233 et 500 de Vaugneray, Rhône.

Enfin, récemment (1972), WEISGRABER, WEISS, MILNE et SILVERTON ont isolé d'une souche de *Corticium caeruleum* l'éther hexaméthylique de l'acide leucothéléphorique (voir p. 95).

*

La souche sur laquelle ont porté nos recherches a été récoltée en Corrèze, à Donzenac, et isolée par M. le Professeur LAUBIE, sur les indications de M. le Professeur ODDOUX, de la Faculté de Pharmacie de Lyon.

Si le Champignon est bleu sur son substrat naturel, le pigment est également élaboré sur des milieux suffisamment riches et contenant, en particulier, de l'extrait de levure.

Au cours de ce travail nous nous sommes attachée à observer l'apparition du pigment en culture, en fonction de l'éclairement (intensité, différentes bandes du spectre) et des éléments nutritifs renfermés dans le milieu de culture, tels que glucose, sources d'azote, vitamines.

La dernière partie expose les recherches portant sur le pigment lui-même (nature et propriétés), rendues particulièrement difficiles en raison de son instabilité.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

*

PREMIERE PARTIE

*

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES

CHAPITRE I

TECHNIQUES GÉNÉRALES DE CULTURE

La souche de *Corticium caeruleum* sur laquelle ont porté les expériences décrites ci-après faisait partie de la mycothèque du Laboratoire. Son origine vient d'être précisée. Cette souche était conservée sur un milieu gélosé, glucosé, à l'extrait de levure, dont la formule est la suivante :

Glucose	20 g
Extrait de levure	5 g
Gélose	20 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Nous avons continué à l'utiliser d'une manière générale, sauf lorsque des études particulières (études de nutrition notamment) nous ont amenée à cultiver le Champignon sur des milieux synthétiques, mieux définis quant à leur composition chimique.

Ce milieu peut être utilisé sous forme de gélose inclinée en tubes bouchés au coton mais, comme il sera précisé plus loin, ce type de culture ne donne pas une pigmentation régulière.

Au contraire, les cultures en boîtes de Petri ne présentent pas cet inconvénient et c'est pourquoi nous les avons adoptées pour l'ensemble de ce travail (boîtes de 10 cm de diamètre avec 25 ml de milieu). En raison des risques de contamination , non négligeables avec ce genre

de récipient, il importe de prévoir une marge de sécurité dans le nombre des cultures mises en oeuvre.

L'inoculum de chaque boîte de Petri est constitué par un disque mycélien de 5 mm de diamètre, découpé avec un emporte-pièce stérile dans une culture vigoureuse du Champignon.

L'incubation s'effectue à la température du laboratoire (entre 22° et 24° C) et en lumière continue.

Après avoir utilisé des tubes "Phytorel" (Cf. p. 21), et d'après les résultats obtenus, nous avons adopté des tubes luminescents Philips "lumière du jour de luxe" type "TL" M 40 W RS dont le spectre s'est révélé convenir parfaitement à la pigmentogenèse du Champignon. Un gradateur permet de faire varier l'intensité.

Dans ces conditions, l'inoculum produit un mycélium stérile, en forme de colonie circulaire, à croissance lente et de couleur blanche jusqu'à un diamètre d'environ 4 cm. Le bleuissement qui apparaît ensuite se développe à partir du centre et s'accentue à la fois en intensité et en surface. A ce stade la colonie présente deux zones concentriques : une zone centrale bleue, et une zone périphérique blanche.

Lorsque la colonie a atteint le bord de la boîte (vers le douzième jour de la culture environ) et ne peut plus s'accroître en surface, la zone bleue poursuit son extension, et au bout de quinze à dix huit jours environ, la culture est entièrement bleue.

Des cultures stationnaires en milieu liquide ont également été effectuées. Le milieu contenant, comme le précédent et aux mêmes doses, du glucose et de l'extrait de levure, était réparti en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml bouchées au coton, à raison de 40 ml par fiole. Cette valeur de 40 ml était choisie pour obtenir une surface de culture voisine de celle du milieu gélosé en boîtes de Petri. Des irrégularités de croissance, et de pigmentation, et un développement plus lent nous ont fait écarter ce type de cultures.

Une tentative de culture en milieu liquide aéré a été faite grâce à un appareillage rudimentaire consistant en un cylindre de verre dans lequel de l'air stérile était pulsé par un petit aérateur.

Le résultat a été décevant, la croissance et la pigmentation étant encore moins bonnes qu'avec les cultures stationnaires.

Quelques essais en fermenteur n'ont pu aboutir, mais il n'est pas exclu que l'utilisation de ce matériel moderne, doté de systèmes de régulation précis, ne donne après une longue et délicate mise au point des résultats concluants.

Nous avons donc choisi comme référence les cultures sur le milieu gélosé décrit plus haut, que nous appellerons G.E.L. (glucose, extrait de levure), des comparaisons (Cf. le chapitre sur la nutrition p. 33) nous ayant montré que la pigmentation était la plus proche de celle observée dans la nature et obtenue dans des délais raisonnables de culture.

ISOLEMENT A PARTIR D'UN SUBSTRAT NATUREL (bois mort)

Bien que la totalité de ce travail ait porté sur la souche de laboratoire mentionnée plus haut, nous avons eu quelques occasions de tenter un isolement à partir de morceaux de bois mort qui nous avaient été apportés au Laboratoire. Certes il est possible de réussir l'isolement par des moyens purement mécaniques (c'est ainsi que la souche Donzenac avait été obtenue), mais l'expérience prouve que les cultures sont très souvent envahies par des moisissures à croissance plus rapide, en particulier *Trichoderma viride*, Adélomycète fréquemment rencontré sur le bois.

Après avoir essayé divers additifs sans grand succès, nous avons eu connaissance des travaux de RUSSEL (1956) qui a mis au point un milieu pour l'isolement des Basidiomycètes lignicoles, inhibant sélectivement les moisissures et en particulier *Trichoderma viride*.

La formule du milieu est la suivante :

Malt	6 g
Peptone	1 g
Agar-Agar	5 g
H_2O	200 ml

On ajoute à cela 1,2 ml de la solution ci après :

Orthophénylphénol	1 g
H_2O	50 ml
Alcool éthylique	50 ml

L'orthophénylphénol à une concentration de 0,006 p. 100 ralentit la croissance de certains Champignons tels que *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*. Il en est de même vis-à-vis de *Trichoderma viride* dont la croissance se trouve stoppée un temps suffisant pour permettre au *Corticium* de se développer et d'être isolé après un ou deux passages sur ce milieu.

Nous avons ainsi pu isoler deux des trois souches qui nous avaient été fournies.

CHAPITRE II

PIGMENTOGENÈSE ET LUMIÈRE

Au cours de la conservation, dans notre collection, de la souche de *Corticium caeruleum*, nous avons constaté fortuitement des irrégularités de pigmentation qu'il nous a semblé possible d'attribuer à des différences d'éclairement entre plusieurs régions du laboratoire.

C'est dans le but d'élucider ce problème que le présent travail a été réalisé.

I - MATERIEL ET METHODES

Pour ces expériences, le Champignon était cultivé sur milieu G.E.L. selon la méthode généralement employée (Cf. exposé général des techniques).

Installée dans une chambre noire dont la température restait voisine de 20° C, la source lumineuse était représentée par une rampe Phytorel (1) comportant quatre tubes fluorescents Phytor I CRHLg dont le spectre possède la caractéristique de fournir en quantité suffisante des radiations bleues et rouges, ce qui les rend adaptés à l'éclairage artificiel des serres. Cette rampe était

(1) Ateliers de construction électrique de Charleroi, Charleroi (Belgique).

disposée à 55 cm au-dessus des cultures de Champignon et pouvait fonctionner en continu ou par intermittence, grâce à une minuterie. L'éclairement reàu par les cultures était de 1000 lux.

Pour réaliser des conditions différentes d'éclairement à partir de la même source lumineuse, nous avons utilisé le filtre neutre Kodak Wratten n° 96 sous plusieurs densités optiques :

Densité optique	*Pourcentage de transmission*
0,10	80 p. 100
0,30	50 p. 100
0,50	32 p. 100
1	10 p. 100
2	1 p. 100

Ces filtres, en feuilles de gélatine, sont découpés en carrés de 25 cm de côté, que l'on monte entre deux plaques de verre neutre ; chaque filtre permet de recouvrir quatre boîtes de Petri de 10 cm de diamètre.

L'influence de la longueur d'onde a été étudiée par absorption sélective au moyen de filtres colorés Kodak Wratten n° 70 (rouge foncé), n° 29 (rouge profond), n° 16 (jaune profond), n° 61 (vert), n° 2A (jaune très pâle) et n° 47 (bleu). Le choix des filtres a été dicté (sauf pour les n° 47 et 61) par le souci d'avoir des transmissions énergétiques de l'ordre de 100 p. 100 plutôt que des bandes relativement étroites mais présentant des pourcentages de transmission énergétique très différents les uns des autres.

L'appréciation du résultat (intensité de la pigmentation) ne peut être que visuelle. Il n'existe en effet aucun procédé de dosage du pigment *in situ*, et un éventuel dosage photométrique après ectraction est rendu très aléatoire par le fait que les deux meilleurs solvants du pigment, l'éthanol et le chloroforme n'en extraient qu'une faible quantité, la plus grande partie restant fixée par la membrane des hyphes.

II - RESULTATS ET DISCUSSION

1- NECESSITE DE LA LUMIERE POUR LA PIGMENTATION.

a) *Culture en lumière continue.*

En lumière continue le Champignon présente une culture uniformément bleue vers le 18 ème jour de sa croissance et se développe comme il a été décrit p. 18.

Il faut noter que, lorsque la colonie a recouvert toute la surface du milieu, la culture n'est pas entièrement bleue. Elle ne le devient totalement qu'au bout de quelques jours.

La production de pigment présente donc un retard sur la croissance.

b) *Culture à l'obscurité.*

La croissance linéaire est légèrement plus rapide qu'en lumière continue (0,5 à 1 cm de plus sur le diamètre, pour une colonie du même âge), mais la pigmentogenèse est pratiquement annulée ; au bout de dix-huit jours, les cultures sont presque totalement blanches, ne montrant que d'infimes traces de pigmentation dispersées çà et là sur le mycélium.

c) *Culture en lumière intermittente.*

(Lumière du jour diffuse avec 15 heures de jour et 9 heures de nuit, ou rampe lumineuse réglée sur la même périodicité).

Le bleuissement est presque aussi intense qu'en lumière continue, toutefois le diamètre de la zone bleue est plus faible. De plus, il apparait une zonation caractérisée par des plages circulaires concentriques de 4 à 5 mm de large, en nombre égal à celui des jours ; chacune de ces plages bleuit avec le retard sur la croissance signalé plus haut, de sorte que l'on observe un dégradé de couleur du centre vers la périphérie. Lorsque la colonie recouvre la totalité de la boîte, ces différences s'estompent, et la culture devient uniformément bleue.

2- INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT.

Elle apparaît dans le tableau suivant et dans la figure 1

Densité du filtre	*Transmission*	*Intensité de pigmentation*
	%	
0 (témoin)	100	+++++
0,10	80	+++++
0,30	50	+++
0,50	32	++
1	10	+
2	1	0

On voit que l'intensité de la pigmentation augmente dans le même sens que l'éclairement ; elle ne subit plus d'accroissement notable pour des éclairements supérieurs à 800 lux environ. Lorsque les cultures reçoivent un éclairement très supérieur à celui réalisé avec la source mentionnée plus haut (cas de la lumière solaire directe, ou d'un éclairement de 3000 lux obtenu avec une autre source) la pigmentation n'est pas améliorée, et la pureté de la couleur est même altérée, montrant alors des nuances d'un gris bleuâtre.

D'autre part, on observe à nouveau que la croissance linéaire, contrairement à la pigmentation, est ralentie par la lumière (Figure 1, p. 27).

3- INFLUENCE DE LA LONGEUR D'ONDE.

Elle est résumée dans le tableau suivant et dans la figure 2, p. 29.

Filtre	*Intensité de la pigmentation*
Ecran opaque (obscurité)	O
pas de filtre (lumière)	+++++
2 A	+++++
47	++++
16	+ (+)
61	+ (+)
29	+
70	+

La comparaison de la courbe de transmission du filtre 2 **A** avec, d'une part celle des filtres 70, 29 et 16 et, d'autre part, celle du filtre 47, permet de conclure à l'efficacité particulière des radiations de longueur d'onde comprise entre 400 et 500 nm, surtout si l'on tient compte de la mauvaise transmission énergétique du filtre 47 : à son maximum de transparence (440 nm) il ne transmet en effet que 50,3 p. 100 de l'énergie qu'il reçoit et, de plus, l'émission de la source à cette longueur d'onde est faible.

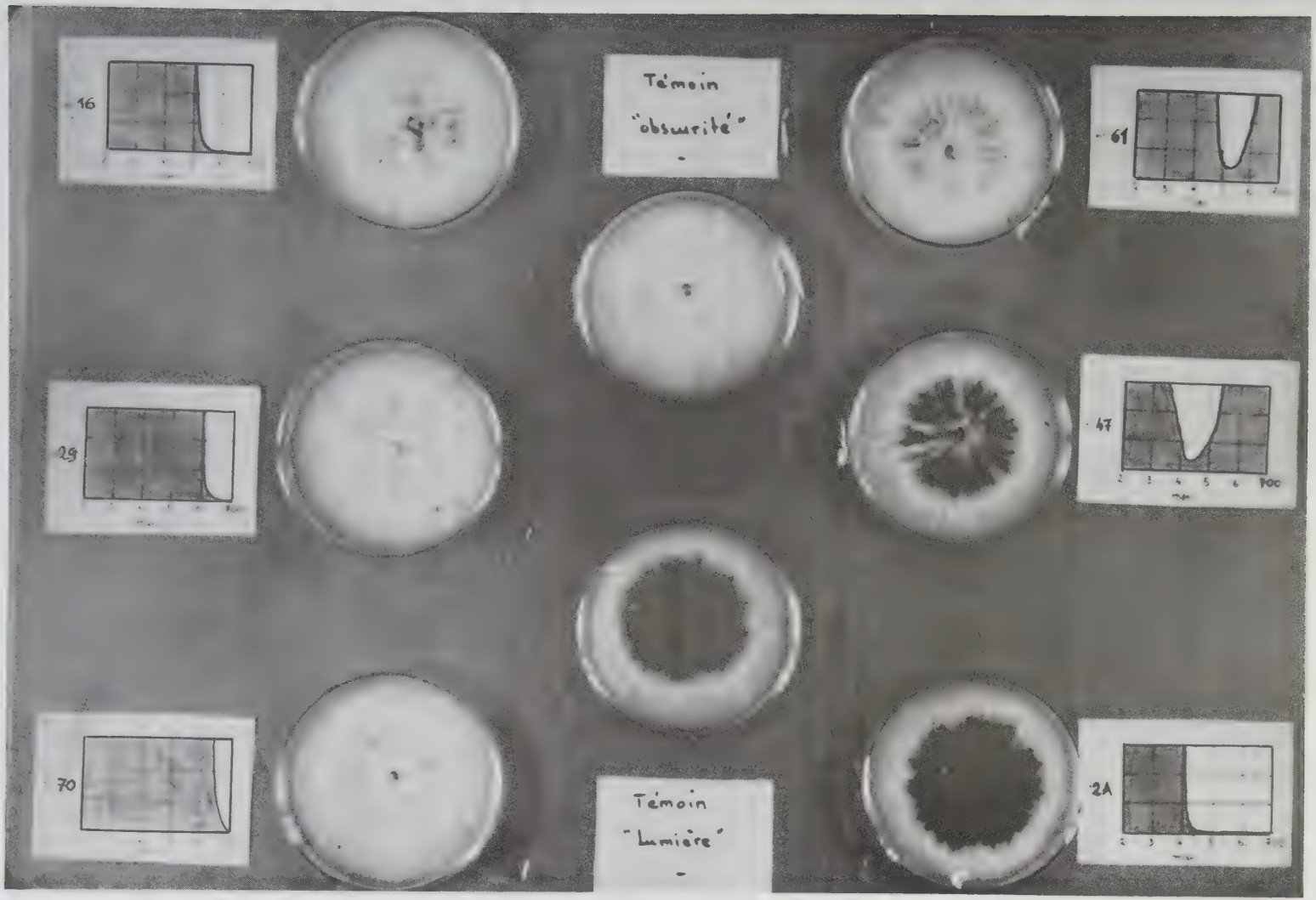
D'autre part, l'action du filtre 61, comparée à celle du filtre 16, permet d'éliminer l'hypothèse d'un éventuel effet inhibiteur des radiations rouges, ainsi que l'action des longueurs d'ondes supérieures à 500 nm que laisse passer le filtre 47.

En résumé, l'apparition du pigment bleu est nettement favorisée par les radiations correspondant à ce que l'on appelle classiquement "la lumière bleue".

Fig. 1 - *Influence de l'éclairement sur la pigmentation (la culture correspondant au filtre de densité 0,10 ne figure pas sur le cliché, mais son aspect était identique à celui du témoin).*

ND 050
ND 1
T
ND 030
ND 2

Fig. 2 - *Influence des lumières de différentes longueurs d'onde sur la pigmentation (sur les courbes de transmission : en abscisse, les longueurs d'onde de 200 à 700 millimicrons ; en ordonnée, le pourcentage de transmission en échelle logarithmique. Ces données sont extraites de la brochure "Filtres Kodak pour l'usage scientifique et technique", éditée par Kodak-Pathé).*


16
Témoin
"obscurité"
61
29
47
700
70
Témoin
"Lumière"
24

4- REMARQUES COMPLEMENTAIRES.

La couleur initiale de l'inoculum n'a aucune influence sur celle du mycélium qui en dérive : un disque prélevé dans une région bleue et incubé à l'obscurité donne une colonie blanche ; inversement, un inoculum blanc engendre, à la lumière, une colonie bleue.

L'action de la lumière sur une colonie blanche obtenue par culture à l'obscurité se manifeste différemment selon l'âge de la colonie. Si celle-ci est relativement jeune (15-20 jours), elle bleuit intensément après une exposition de quelques heures à 1000 lux. Si, au contraire, la colonie est plus âgée (25-35 jours) une exposition, même prolongée, à la lumière, s'avère incapable de faire apparaître le pigment. Parmi les diverses explications possibles, aucune ne peut être actuellement retenue de préférence à une autre, mais il est vraisemblable que l'appauvrissement du milieu en substances nutritives joue un rôle dans ce phénomène.

III - CONCLUSIONS

Dans les conditions de culture définies plus haut, la souche de *Corticium caeruleum* étudiée se montre dépendante de la lumière pour sa pigmentation bleue.

Si l'on se rapporte à des travaux ayant pour but de rechercher les longueurs d'ondes les plus actives sur la pigmentogenèse de quelques Champignons, parmi lesquels ceux de SMITH et SWINGLE (1904) sur *Fusarium oxysporum*, de BESSEY (1904) sur d'autres *Fusarium*, de ROBINSON (1926) sur *Pyronema confluens*, de MUNTANJOLA-CVETKOVIC (1965) sur des *Aspergillus*, on voit que ces longueurs d'ondes correspondent à des radiations situées dans le bleu-violet. *C.caeruleum* peut donc être rapproché de ces espèces en ce qui concerne sa pigmentogenèse à la lumière.

Insistons encore sue le fait que ces résultats s'appliquent à une seule souche étudiée en culture, au laboratoire ; en conséquence, il serait hasardeux de les extra-

poler aux conditions de vie du Champignon dans la nature. Toutefois, on peut remarquer que la lumière d'ombre qui règne dans les sous-bois est connue pour sa richesse relative en radiations bleues, ce qui va dans le sens de nos résultats.

C H A P I T R E III

PIGMENTOGENÈSE ET NUTRITION

Après avoir démontré l'action de la lumière sur la pigmentogenèse de *C. caeruleum*, il était normal de s'orienter vers l'étude des facteurs nutritionnels. Ces facteurs ayant également une action sur la croissance, nous avons été amenée à l'étudier parallèlement à la production du pigment.

Ayant examiné le comportement du Champignon sur divers milieux naturels et synthétiques, nous nous sommes attachée à l'étude particulière de certains composants de ces milieux : aliments azotés et vitamines.

I - TECHNIQUES

Les cultures sont faites sur milieu gélosé, coulé en boîtes de Petri de 10 cm de diamètre. Chaque boîte renferme 25 ml de milieu.

1- MILIEUX DE CULTURE.

a) Milieu de référence.

Le milieu de référence est le milieu glucosé à l'extrait de levure (milieu G.E.L.), déjà défini dans les techniques générales de culture et utilisé durant les travaux sur l'action de la lumière.

b) Milieux d'étude.

Les différentes substances à étudier sont incorporées tour à tour à un milieu de base convenablement choisi (comme il sera exposé ultérieurement p.), et chaque composé figure dans un nombre suffisant de boîtes (dix en général) pour qu'une moyenne des résultats permette d'éliminer les légères variations survenant entre les cultures d'un même lot.

Il convient de noter que certains essais ont également été effectués en milieu liquide, mais des irrégularités plus nombreuses dans des séries identiques et certaines difficultés de mesure nous ont fait préférer les milieux de culture solides en règle générale. En outre, la croissance s'effectue plus rapidement en milieu gélosé, la submersion fréquente de l'inoculum en milieu liquide ralentissant le développement au début et retardant l'apparition de la pigmentation. Enfin se trouvent minimisées les irrégularités de croissance d'un récipient à l'autre, inhérentes aux cultures en milieux liquides et que les cultures sur gélose ne présentent qu'à un moindre degré (1).

Dans ces expériences sur la nutrition, nous avons réalisé les milieux gélosés au moyen de gélose "Bacto purified agar" DIFCO, afin de limiter autant qu'il est possible l'introduction de certains facteurs (vitamines, oligo-éléments) qui accompagnent souvent la gélose ordinaire. Cette précaution ne dispense pas pour chaque essai de réaliser des "témoins-gélose", c'est-à-dire de cultiver le Champignon sur le milieu gélosé ne contenant pas le produit à étudier, la gélose étant toujours susceptible de conserver, même après purification, des traces d'éléments dont la présence modifierait les résultats.

(1) *On admet que ces irrégularités proviennent surtout des différences d'aération d'une fiole à l'autre, que la standardisation du bouchage au coton ne suffit pas à annuler ; cet inconvénient n'existe pas avec des boîtes de Petri convenablement choisies.*

2- INOCULATION.

Afin encore d'uniformiser le plus possible les techniques, l'inoculum est représenté par un disque de 5mm de diamètre découpé dans une culture sur gélose, le choix de cette "culture-mère" étant conditionné par le type d'expérience à réaliser (ce point sera précisé dans chaque cas particulier).

3- INCUBATION.

Les cultures sont exposées durant toute leur croissance à une lumière continue fournie par une rampe lumineuse portant les tubes fluorescents Philips "lumière du jour de luxe" dont il a déjà été question plus haut (p. 18).

4- EVALUATION DE LA CROISSANCE ET DE LA PIGMENTATION.

Pour évaluer la croissance on procède à deux séries de mesures effectuées simultanément sur tous les lots, au moment où les cultures du lot témoin ont recouvert la surface du milieu contenu dans chaque boîte de Petri (on peut également dans certaines expériences évaluer la croissance en fonction du temps) :

- mesure du diamètre des colonies : on mesure sur chaque culture les diamètres respectifs des zones pigmentées en bleu et des zones blanches du mycélium.
- mesure du poids sec des mycéliums : il importe pour cela de séparer chaque mycélium de la gélose, avant dessiccation à l'étuve. On y parvient en procédant pour chacun à plusieurs lavages successifs dans de l'eau distillée bouillante renouvelée chaque fois. BAUTE (1964), qui a utilisé cette technique répond aux objections concernant la perte de composés hydrosolubles, survenant lors de l'opération, par le fait que l'on rapporte toujours les résultats à une culture témoin traitée dans les mêmes conditions.

Des précisions complémentaires seront données dans la suite de l'exposé.

II - COMPORTEMENT DU CHAMPIGNON SUR DIFFERENTS MILIEUX NATURELS OU SYNTHETIQUES

1 - MILIEUX NATURELS.

Les milieux suivants ont été étudiés :

- Milieu au Maltea Moser (1)

Maltea-Moser	10 g
Gélose	15 g
Eau distillée q.s.q.	1000 ml

- Milieu Corn Meal agar DIFCO

Corn Meal	50 gr }	17 g dans
Bacto agar	15 gr }	1000 ml d'eau

- Milieu Sabouraud-conservation

Peptone	30 g
Gélose	20 g
Eau distillée	1000 ml

- Milieu G.E.L. modifié (en faisant varier la concentration en glucose de 5 g p.1000 à 40 g p. 1000).

Rappelons que le milieu G.E.L. est un milieu glucosé à l'extrait de levure.

RESULTATS.

1- Milieu au Maltea Moser :

Le pigment bleu apparaît, mais il est d'une teinte un peu plus claire que la normale. D'autre part, le mycélium est moins épais que sur G.E.L. et fortement zoné.

(1) Le Maltea Moser est préparé par la Société Nouvelle Moser et Cie. 45 Pithiviers.

2- *Milieu au Corn Meal DIFCO :*

Sur ce milieu, le mycélium a un aspect clairsemé. Il est formé de filaments assez rares rayonnant autour de l'inoculum. Seuls certains filaments sont colorés et ils ont une teinte bleue moins foncée que celle obtenue habituellement sur milieu G.E.L.

3- *Milieu Sabouraud-conservation :*

Le mycélium, après avoir commencé à croître, ne parvient pas à poursuivre son développement. La présence de tyrosinase (BOIDIN, 1968) conduit à un brunissement rapide du milieu : celui-ci, d'abord coloré en jaune pâle, devient brunâtre au niveau de l'inoculum et cette teinte brune gagne peu à peu tout le milieu gélosé. La colonie ne parvient pas à se développer sur toute la surface du milieu de culture.

BOIDIN attribue la teinte ainsi prise par le milieu à la formation de mélanine au sein de celui-ci.

Dans le cas présent, la tyrosinase provient à la fois du fragment de gélose apporté avec l'inoculum (la diffusion ayant eu lieu durant la culture à partir de laquelle on effectue le prélèvement), et du Champignon lui-même en cours de culture.

Sur un tel milieu, le mycélium a une teinte jaunâtre. On remarque toutefois qu'il est plus blanc lorsqu'on laisse la culture s'effectuer à l'abri de la lumière. En ce qui concerne la croissance, elle est identique pour le lot qui est éclairé et celui qui est laissé à l'obscurité, on n'obtient pas de différence en faisant varier les conditions d'éclairement.

4- *Milieu G.E.L. modifié :*

A partir des résultats obtenus sur le milieu G.E.L., nous avons été amenée à modifier celui-ci pour rechercher les éléments qui, parmi les constituants de ce milieu, pouvaient jouer un rôle dans la croissance et la pigmentogenèse.

Eau mise à part, ces constituants sont au nombre de deux :

- le glucose
- l'extrait de levure, de composition chimique complexe, comportant notamment de nombreux facteurs vitaminiques.

Une des expériences les plus simples consistait à faire varier la concentration en glucose dans le milieu G.E.L. C'est ce qui a été réalisé avec les concentrations suivantes :

Glucose
0 g p. 1000
5 g p. 1000
10 g p. 1000
15 g p. 1000
20 g p. 1000 (dose du G.E.L. normal = témoin)
25 g p. 1000
30 g p. 1000
35 g p. 1000
40 g p. 1000

La lecture est faite après 7 à 8 jours de culture

Résultats :

En l'absence totale de glucose, le Champignon ne produit qu'un mycélium ras et clairsemé, entièrement blanc. Il est donc encore capable de se développer un peu, et ce, grâce aux réserves contenues dans l'inoculum. Mais il ne peut plus produire de pigment.

A la concentration de 5 g p. 1000 de glucose apparaît une pigmentation, mais moins importante que celle du témoin.

Aux doses de 10 g p. 1000 et de 15 g p. 1000 les différences avec les cultures sur G.E.L. normal sont moins sensibles ; toutefois la culture marque un temps d'arrêt au début de son développement et, si elle prend par la suite un aspect normal c'est avec un retard dans le temps par rapport au témoin.

Pour les doses supérieures à 20 g p. 1000 les cultures ne marquent pas de temps de latence, mais au fur et à mesure que la concentration en glucose s'accroît dans le milieu, le diamètre total de la culture et celui de la zone pigmentée diminuent progressivement par rapport au témoin. Il y aurait donc un ralentissement de la croissance linéaire du Champignon.

2- MILIEUX SYNTHETIQUES.

Comme point de départ des expériences sur les milieux synthétiques, nous avons cherché un milieu ne contenant pas de facteurs de croissance, donc pouvant servir de milieu de base à leur étude, et dans lequel on modifierait au besoin la source d'azote.

D'autre part, il était nécessaire que sur ce milieu la culture de *C. caeruleum* restât blanche pour pouvoir observer l'apparition éventuelle du pigment selon les modifications apportées.

Nous avons retenu pour ce travail le milieu de Czapek, très classique en mycologie, qui offre l'avantage d'être le milieu synthétique le plus simple. Certaines conditions expérimentales nous ont parfois amenée à lui faire subir quelques modifications, mais chaque fois nous avons essayé de rester le plus près possible de la formule de départ.

Formule du milieu de Czapek :

$NaNO_3$	2 g
KCl	0 g 50
$MgSO_4$, $7H_2O$	0 g 50
$FeSO_4$, $7H_2O$	0 g 01
K_2PO_4H	1 g
Saccharose	30 g
Gélose	20 g
H_2O distillée q.s.p.	1000

Sur ce milieu la culture reste blanche. Le mycélium est clairsemé et zoné. La vitesse de croissance de la culture est, en outre, inférieure à celle observée sur milieu G.E.L.

Modifications du milieu de Czapek :

a) Utilisation de gélose purifiée :

La gélose ordinaire en fibres, utilisée lors de l'étude de l'action de la lumière, a été abandonnée au profit d'une gélose purifiée DIFCO pour écarter tous les éléments incontrôlables qu'elle aurait pu introduire.

b) Remplacement du saccharose :

Compte tenu des observations précédentes sur l'influence de la concentration en glucose sur la pigmentogenèse, et pour nous rapprocher le plus possible des conditions réunies dans le milieu G.E.L., nous avons remplacé dans le milieu de Czapek le saccharose par du glucose, introduit à raison de 20 g par litre.

c) Remplacement de l'ion nitrate en tant que source d'azote :

Il n'est pas exceptionnel que des Champignons empruntent l'azote dont ils ont besoin aussi bien à l'ion NO_3^- qu'à d'autres sources telles que sels d'ammonium ou molécules azotées organiques. HAWKER (1950) signale, avec d'autres auteurs, que ce comportement est celui de la majorité d'entre eux.

Nous appuyant sur ces observations, et pour tenter d'améliorer le milieu de base, (en particulier pour obtenir une meilleure vitesse de croissance) Na NO_3 a été remplacé successivement par :

- de l'urée (0g 70 par litre de milieu)
- du citrate d'ammonium (2g 65 par litre de milieu)
- du chlorure d'ammonium (1g 25 " " ").

Ces concentrations respectives étaient calculées de manière à respecter l'équivalence en azote.

RESULTATS OBTENUS.

N.B. : Pour une interprétation correcte des résultats, il est nécessaire d'étudier parallèlement au témoin cultivé sur G.E.L. un témoin se développant sur le milieu de base non modifié, la vitesse de croissance du Champignon étant inférieure sur ce dernier à celle observée sur G.E.L., comme il a été signalé précédemment.

- Avec l'urée :

Sur ce milieu, la croissance est rapidement stoppée avec un brunissement accentué du milieu. Ce phénomène n'est pas sans rappeler , quant à son déroulement, celui

noté précédemment sur milieu peptoné et où intervenait la tyrosinase produite par le Champignon, comme le notait BOIDIN (1968) ; mais il faut cependant se garder à ce propos de conclusions trop hâtives.

- Avec le citrate d'ammonium :
La croissance est assez rapide, le mycélium est blanc, fin, clairsemé.

- Avec le chlorure d'ammonium :
La diminution du pH des milieux contenant des sels d'ammonium d'acides forts comme seule source d'azote est bien connue des chercheurs. HAWKER (1950), parmi d'autres, ne manque pas de le rappeler. Elle est due à la libération de l'acide libre et sera en rapport avec la force de cet acide.
Pour pallier cette acidification, nous avons effectué les cultures en opérant comparativement sur deux lots dont l'un renfermait un tampon.

La croissance du Champignon est assez lente dans les deux cas. Le mycélium est clairsemé, zoné ; la deuxième génération présente un mycélium qui s'enfonce dans le milieu au lieu de se développer à la surface et son développement est rapidement stoppé. Sur milieu non tamponné, il y a de légères traces bleues, tandis que l'on n'observe aucune pigmentation avec le milieu tamponné.

CONCLUSIONS.

A la suite de ces essais, nous avons décidé d'utiliser le citrate d'ammonium à la place du nitrate de sodium dans le milieu de base et, ce, pour plusieurs raisons :

. La croissance sur milieu au citrate est plus rapide.

. L'utilisation du chlorure d'ammonium, possible également, imposait d'opérer en milieu tamponné, puisque l'un des buts recherché était d'obtenir un mycélium entièrement blanc. Avec le citrate il n'est pas nécessaire d'utiliser un tampon et la préparation du milieu s'en trouve simplifiée.

. Le citrate enfin, contrairement au chlorure, permet d'ob-

tenir à la deuxième génération suffisament de mycélium pour prélever les inoculums utilisés lors des diverses expériences de nutrition

d) Addition de facteurs de croissance.

Après les diverses modifications apportées au milieu de Czapek, la formule du milieu de base peut s'établir ainsi :

Citrate d'ammonium	2 g 65
K Cl	0 g 50
$Mg\ So_4\ ,\ 7\ H_2O$	0 g 50
$Fe\ SO_4\ ,\ 7\ H_2O$	0 g 01
$K_2\ PO_4H$	1 g
Glucose	20 g
Gélose purifiée	20 g
Eau distillée q.s.p.	1000

On obtient ainsi un milieu ne contenant pas de facteurs de croissance sur lequel le Champignon parvient à se développer lors de deux repiquages successifs, mais a une croissance pratiquement nulle à la troisième génération.

Donc le Champignon ne peut continuer à croître en l'absence totale de facteurs vitaminiques (dans le milieu de Czapek normal la gélose non purifiée pouvait encore en apporter des traces). Ceux-ci sont encore apportés au milieu avec le premier inoculum, mais sont rapidement épuisés lors des cultures successives, et le développement cesse, le Champignon étant ici incapable d'en effectuer la synthèse à partir des éléments présents dans le milieu de base.

Ce comportement, favorable à l'utilisation de ce milieu de base pour l'étude de l'action des facteurs de croissance, nécessite l'addition systématique de ces mêmes facteurs lorsqu'on veut étudier d'autres éléments nutritionnels, tels que différentes sources d'azote, comme il sera fait plus loin.

Dans ce cas a été ajoutée au milieu une solution semblable à celle qui est utilisée par LODDER et KREGER-VAN RIJ (1952) pour la culture des levures.

Solution vitaminique :

Biotine	2 µg
Inositol	2000 µg
Panthothénate de calcium Nicotinamide Pyridoxine Thiamine	400 µg
Riboflavine	200 µg
H_2O distillée	10 ml

0,5 ml de cette solution sont ajoutés à 4,5 ml d'eau distillée stérile et 0,05 ml de cette solution concentrée sont ajoutés au milieu.

Disposant ainsi d'un milieu de base contenant des facteurs de croissance, il était possible d'entreprendre l'étude du rôle joué par différentes sources d'azote dans le développement et la pigmentogenèse de *Corticium caeruleum* tandis que le milieu de base sans vitamines permettait des recherches similaires quant à ces dernières.

III - ROLE DES ACIDES AMINES EN TANT QUE SOURCE D'AZOTE

L'influence de ces composés sur la pigmentogenèse du Champignon a été étudiée en introduisant dans le milieu de base dépourvu de source d'azote (milieu précédemment défini) chaque amino-acide séparément, ainsi que la solution vitaminique indiquée plus haut.

La pigmentation ne pouvant être, *à priori*, dissociée de la croissance, nous avons également mesuré celle-ci.

Ces expériences comportaient trois sortes de témoins : sur milieu G.E.L., sur milieu synthétique au citrate d'ammonium, et sur milieu sans azote.

Les acides aminés essayés sont les suivants :

L-alanine	glycocolle	L-sérine
L-arginine	L-histidine	L-thréonine
L-asparagine	L-leucine	L-tryptophane
ac.L-aspartique	L-lysine	L-tyrosine
L-cystéine	L-méthionine	L-valine
ac. L-glutamique	L-phénylalanine	
	L-proline	

Lors de la préparation des milieux de culture, la solution vitaminique est stérilisée par filtration à froid à travers une membrane Millipore GSWP 022 (pores de 0,22 µ de diamètre) tandis que les milieux de base sont autoclavés, l'addition de la solution vitaminique s'effectuant au moment de couler dans les boîtes de Petri le milieu gélosé.

L'inoculum destiné à fournir la culture en expérience est ici prélevé sur un mycélium ayant poussé pendant une génération sur milieu sans source d'azote. Le repiquage se fait à partir de cette première génération, selon la technique décrite plus haut.

Chaque acide aminé a été introduit dans un nombre suffisant de boîtes de milieu (dix) ; les séries témoins comportant également dix boîtes.

Après incubation dans les conditions définies au début de ce chapitre, on a évalué le poids sec des mycéliums obtenus sur les différents milieux, selon la technique décrite. Pour chaque acide aminé on a ensuite calculé la moyenne arithmétique des valeurs obtenues.

RESULTATS

Seuls trois acides aminés (la L-asparagine, la L-sérine et le glycocolle) permettent la pigmentogenèse. Il en est de même du citrate d'ammonium (agissant ici en présence de vitamines). L'intensité de la coloration est la même dans tous les cas.

Si l'on calcule le rapport entre le diamètre de la zone pigmentée et le diamètre de la colonie, on peut classer ces quatre sources d'azote par ordre d'efficacité croissante comme suit en ce qui concerne la pigmentogenèse.

- L-sérine : 50 % du diamètre total sont pigmentés
- Citrate d'ammonium : 40 %
- L-asparagine : 35 à 40 %
- glycocolle : 16 %

Il est intéressant d'examiner parallèlement l'action des amino-acides sur la croissance, qui est résumée par le graphique de la figure 3

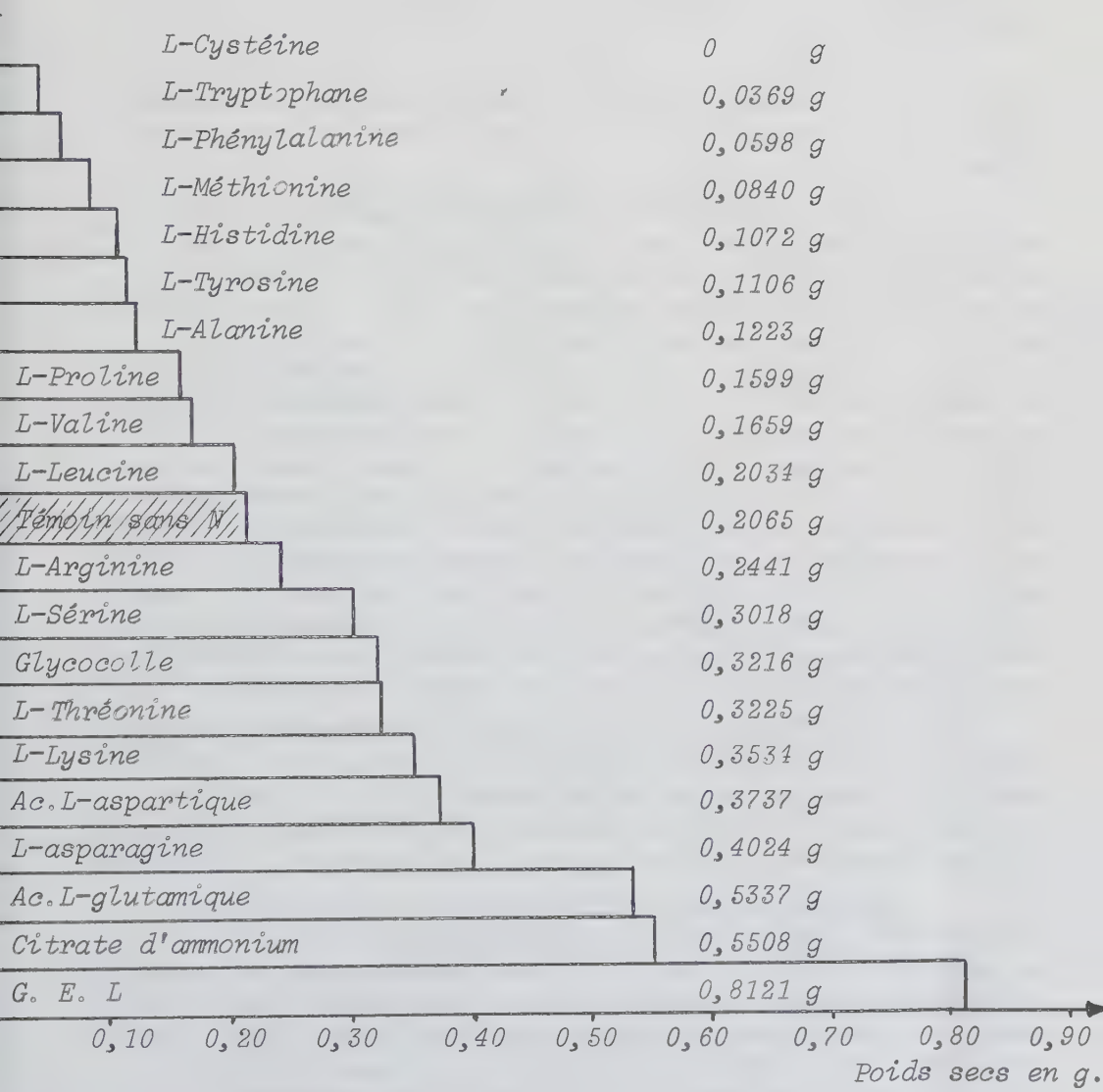


Fig. 3 - Action des amino-acides sur la croissance.

On constate en premier lieu que le milieu dit "sans azote"a quand même permis un certain développement du Champignon. Il a été, en effet, impossible de prélever un inoculum sur une souche ayant subi plusieurs passages successifs sur milieu sans azote, une "deuxième génération" ne se développant pratiquement pas. La croissance que l'on observe est due, vraisemblablement, à l'utilisation, par le Champignon, de ses propres réserves et de celles apportées par le milieu accompagnant l'inoculum.

D'autre part, malgré les précautions prises lors du choix de la gélose, celle-ci peut n'être pas totalement exempte d'impuretés azotées qui contribueraient à favoriser un début de croissance.

Quoi qu'il en soit, le témoin sans azote permet de répartir les acides aminés en deux groupes. Certains conduisent à des poids secs inférieurs à ceux du témoin et ne sont donc pas vraisemblablement utilisés ; corrélativement on n'observe aucune pigmentation, comme il paraît logique. Les autres, situés dans le graphique au-dessous du témoin donnent lieu à des croissances inégales, les deux extrêmes étant représentés par la L-arginine et par l'acide L-glutamique. Or dans ce second groupe, seuls les trois acides aminés cités plus haut permettent la pigmentogenèse La L-thréonine, la L-lysine sont sans action. Mieux, l'acide L-aspartique, dont l'efficacité sur la croissance le rapproche de la L-asparagine, ne permet pas non plus la pigmentation. Il en est de même de l'acide L-glutamique qui, pourtant donne les poids secs les plus élevés de la série (citrate d'ammonium et G.E.L. mis à part).

Il ne nous a pas été possible d'expliquer ces différences, tout ce que nous pouvons dire c'est que l'utilisation de certains amino-acides comme source d'azote par le mycélium de *Corticium caeruleum* ne suffit pas à assurer la pigmentogenèse, même en présence de vitamines.

La littérature, qui est assez riche en travaux portant sur la croissance, ne nous a guère fourni d'éléments de comparaison concernant la pigmentogenèse dans le cas de recherches sur la nutrition azotée. BAUTE (1964) avait observé des phénomènes semblables avec *Epicoccum nigrum*, avec une complication supplémentaire due à l'existence de plusieurs pigments de couleurs différentes et sensibles au pH du milieu.

En outre, il convient de remarquer aussi que, quelle que soit la source d'azote employée, les résultats obtenus ne reproduisent pas totalement ceux donnés par le milieu G.E.L. La pigmentogenèse est toujours plus faible que celle que procurent les constituants de l'extrait de levure. Enfin, lorsque la pigmentation du mycélium est marquée, il faut observer que la nuance du bleu n'est pas exactement la même que sur G.E.L. Elle est un peu plus vive et légèrement plus claire.

IV - ROLE DES VITAMINES

Nous avons étudié les facteurs vitaminiques suivants :

Biotine
Inositol
Nicotinamide
Pyridoxine
Riboflavine
Pantothénate de calcium
Thiamine
Acide para-aminobenzoïque

Ce sont ceux qui figurent dans la plupart des travaux mentionnés dans les ouvrages classiques de physiologie fongique (COCHRANE, HAWKER, LILLY et BARNETT, déjà cités), on les retrouve dans la solution préconisée par LODDER pour la culture des Levures.

Ces facteurs ont été utilisés isolément ou en mélanges ; les concentrations étaient celles qu'indique LODDER :

Biotine	2.10^{-3}	mg/l
Pantothénate de calcium	4.10^{-1}	"
Inositol	2	"
Nicotinamide	4.10^{-1}	"
Ac.p. aminobenzoïque	2.10^{-1}	"
Pyridoxine	4.10^{-1}	"
Thiamine	4.10^{-1}	"
Riboflavine	2.10^{-1}	"

Nous avons déjà signalé l'importance d'effectuer les cultures dans des conditions tendant à éliminer toutes traces de facteurs de croissance, ce qui implique l'emploi d'une verrerie rigoureusement propre. Celle-ci est donc traitée par le mélange sulfochromique et rincée abondamment, en utilisant de l'eau distillée pour les derniers rinçages.

Afin également d'éviter la présence de facteurs vitaminiques provenant du substrat qui accompagne l'inoculum, celui-ci est prélevé après avoir cultivé le Champignon durant deux générations sur un milieu sans vitamines (culture de deuxième génération). Une telle technique est préconisée par de nombreux auteurs (HAWKER, COCHRANE, LILLY et BARNETT, 1951).

Les expériences antérieures sur la nutrition azotée nous ont incitée à choisir comme milieu de base ne contenant pas de facteurs vitaminiques le milieu synthétique au citrate d'ammonium (déjà décrit), en utilisant comme source de carbone du glucose purissime pour bactériologie FLUKA.

Les essais se déroulant en milieu solide comportent l'emploi de gélose purifiée DIFCO, pour les mêmes raisons.

Selon un principe déjà suivi lors de l'étude des sources d'azote, les observations portent chaque fois sur des séries de boîtes ou de fioles de milieu contenant la ou les vitamines à étudier. Les résultats enregistrés pour la croissance représentent des moyennes arithmétiques. L'expérience s'opère en présence de témoins : un témoin G.E.L., c'est-à-dire une série de cultures sur milieu à l'extrait de levure, un milieu contenant un mélange de toutes les vitamines et un témoin sans facteurs vitaminiques pour lequel on utilise de l'eau distillée stérile à la place de la solution vitaminique.

Les facteurs de croissance sont dissous dans une partie de l'eau qui entre dans la composition du milieu, et les solutions ainsi obtenues sont stérilisées par filtration à travers une membrane Millipore GSWP de porosité 0,22µ avant d'être ajoutées aux autres constituants.

Les sels minéraux et la gélose, dissous dans une autre fraction de l'eau entrant dans la composition du milieu, sont stérilisés par autoclavage.

Le glucose, dissous dans le reste de l'eau est égale-

ment autoclavé mais n'est incorporé au milieu qu'ensuite, en même temps que la solution vitaminique pour éviter une éventuelle modification (caramélisation) de ce sucre au contact des sels minéraux sous l'influence de la chaleur.

L'évaluation des résultats s'opère de même façon que pour la nutrition azotée.

RESULTATS

L'examen des graphiques de la figure 4 montre tout d'abord qu'en l'absence de vitamines aucune croissance n'est enregistrée (graphique A). Rappelons à ce propos que le milieu comporte de la gélose purissime et qu'il s'agit d'une troisième génération, ceci pour lever la contradiction apparente avec ce qui a été signalé lors de l'étude du comportement du Champignon sur milieu synthétique.

Parmi les vitamines, seule la thiamine permet une croissance et une pigmentation appréciables; de plus, celles-ci sont pratiquement identiques à celles que l'on observe avec le mélange vitaminique.

Signalons toutefois que les autres vitamines donnent lieu à la production d'un mycélium trop ténu pour être pesé, mais dont il est possible néanmoins d'apprécier visuellement le diamètre. C'est ce qu'exprime par des pointillés le graphique B. Mais en aucun cas, ces mycéliums ne montrent la moindre pigmentation bleue.

Enfin, comme pour les sources d'azote, on constate que c'est le milieu G.E.L. qui donne les meilleurs résultats.

Cette observation n'est pas surprenante. COCHRANE a noté pour sa part le rôle de l'extrait de levure sur la pigmentogenèse lors de la synthèse du cytochrome chez *Ustilago sphaerogena*, et signale en outre, avec LILLY et BARNETT, que la thiamine est la vitamine la plus souvent requise par les Champignons. *C. caeruleum* ne fait donc pas exception à ce mode de comportement.

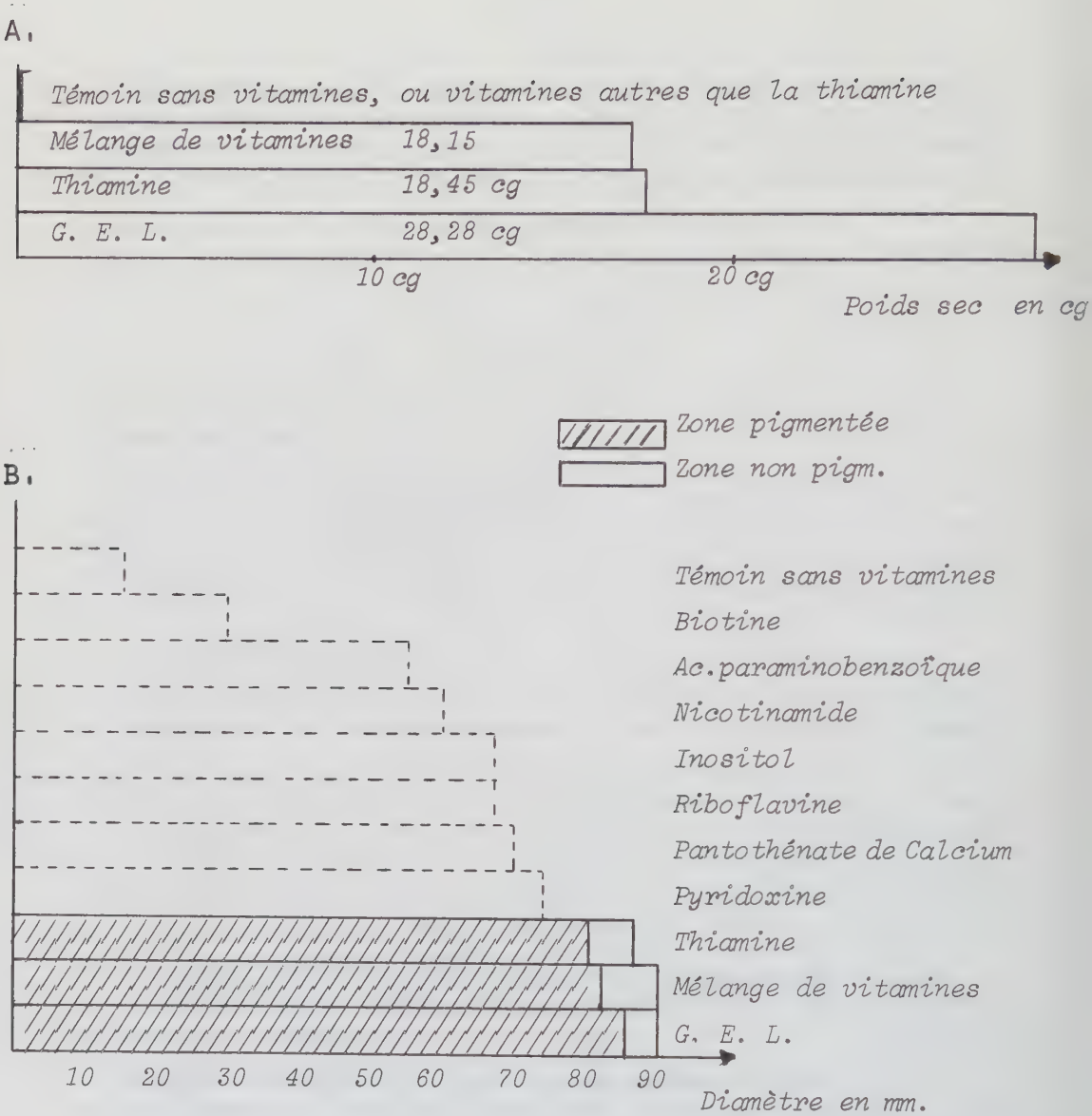


Fig. 4 - Influence des vitamines sur la croissance et la pigmentogenèse de Corticium caeruleum *(vitamines prises isolément).*

A. Croissance pondérale (poids secs exprimés en cg).

B. Croissance linéaire et pigmentation (la partie hachurée correspond au diamètre de la zone pigmentée).

Le rôle prépondérant de la thiamine dans la pigmentogenèse a été confirmé par la réalisation d'un milieu dépourvu de cette vitamine mais renfermant toutes les autres. Sur ce milieu, on observe une légère croissance mais pas de pigmentation. Pour pratiquer une contre-épreuve, le Champignon a été cultivé aussi sur des séries de milieux dans lesquels on supprimait une vitamine par lot, à l'exception de la thiamine qui était présente dans tous les lots.

Toutes ces cultures ont présenté un bleuissement.

Le rôle de la thiamine dans la pigmentogenèse du Champignon paraît ainsi bien établi.

*

De même que pour les sources d'azote, la littérature ne nous a pas apporté d'éléments de comparaison concernant la pigmentogenèse considérée indépendamment de la croissance.

En revanche, l'action de la thiamine sur la croissance des Champignons est bien connue ; ODDOUX ne manque pas de le rappeler. Parmi les cas d'auxotrophies vitaminiques, ceux à l'égard de la thiamine sont les plus répandus. Les *Corticium* n'avaient pas été étudiés à ce point de vue, mais FRIES (1948) avait signalé que des Champignons du genre voisin, *Peniophora*, réclamaient de la thiamine pour se développer.

Etant parvenue à ce stade de notre expérimentation, il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de la concentration en thiamine du milieu.

RECHERCHE DE LA CONCENTRATION OPTIMALE EN THIAMINE.

La meilleure régularité des cultures sur milieu solide et la possibilité d'utiliser de la gélose purissime, nous ont incitée à mettre en oeuvre ce type de culture, comme nous l'avions fait pour les expériences précédemment décrites.

Les concentrations en thiamine ont été choisies en tenant compte, d'une part du milieu de LODDER déjà cité et, d'autre part, des indications fournies par la littérature pour des expériences du même type. Comme précédemment, les solutions de vitamine ont été stérilisées par filtration à travers des membranes Millipore GSWP 022 (pores de 0,22 µ de diamètre).

Les résultats concernant la croissance apparaissent dans la courbe de la figure 5 qui présente un maximum à allure de plateau pour les concentrations de l'ordre de 4.10^{-3} à 4.10^{-2} mg/l.

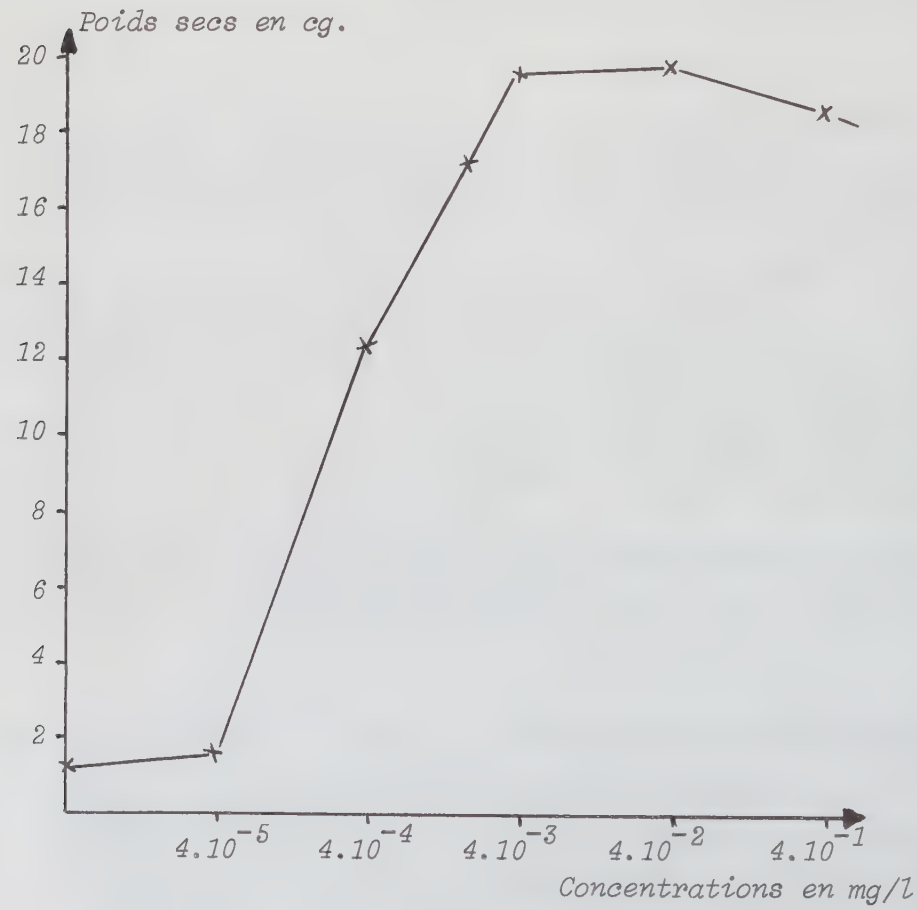


Fig. 5 - Influence de la concentration en thiamine sur la croissance.

L'infléchissement observé pour la concentration 4.10^{-1} mg/l est peut-être à rapprocher des observations de certains auteurs qui constatent qu'un excès de thiamine inhibe la croissance de certains Champignons [SCHOPFER, ELLIOT, ESPOSITO, LILLY et BARNETT, cités dans divers ouvrages, notamment par AINSWORTH et SUSSMAN (1965)].

La raison de cette action n'est pas claire ; certains l'attribuent à une production exagérée d'alcool (1) due à un excès de carboxylase qui a, on le sait, pour coenzyme le pyrophosphate de thiamine. Il ne nous a pas été possible de vérifier cette théorie, et notre expérience ne comporte malheureusement pas de doses supérieures à 4.10^{-1}.

En ce qui concerne la pigmentation, elle est résumée par le graphique de la figure 6. Elle n'apparaît qu'à partir d'une concentration de 4.10^{-3} mg/l (partie hachurée).

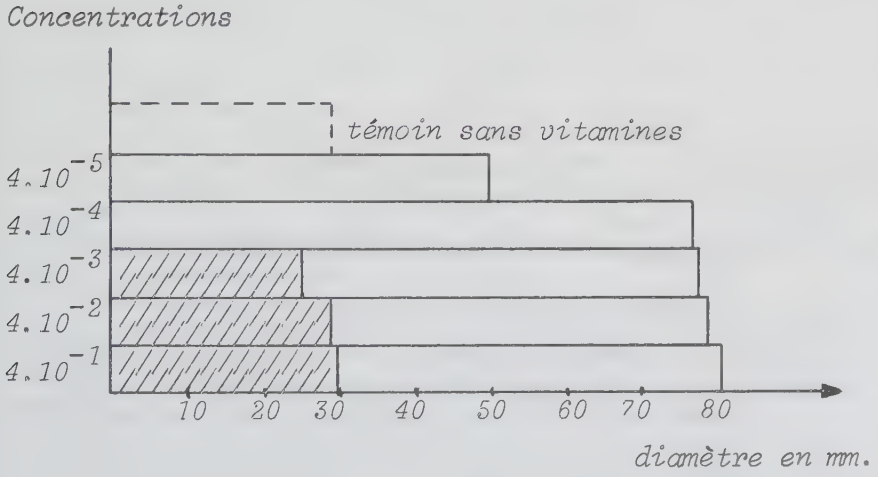


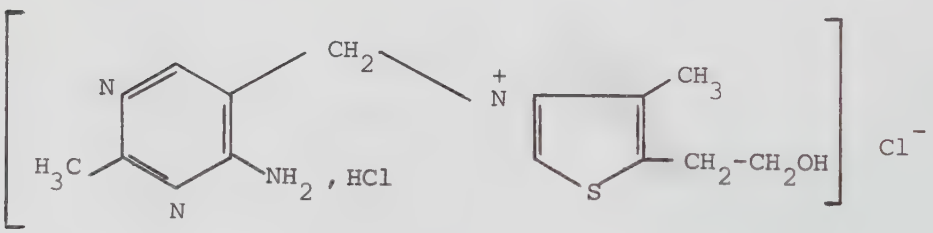
Fig. 6 - Influence de la concentration en thiamine sur la pigmentogenèse.

(1) Précisons que certains Champignons (Fusarium, Aspergillus *et sans doute d'autres) peuvent produire de l'éthanol en conditions aérobies.*

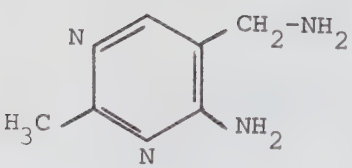
Après avoir reconnu le rôle joué par la thiamine dans la croissance et la pigmentation de *C.caeruleum*, nous avons voulu savoir si le Champignon exigeait la molécule entière, ou s'il lui était possible d'en synthétiser l'ensemble en en fournissant lui-même une fraction.

ETUDE DES FRACTIONS PYRIMIDIQUE ET THIAZOLIQUE DE LA THIAMINE.

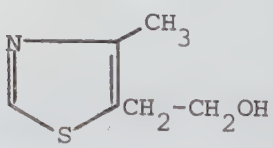
On sait que la molécule de thiamine (formule I) peut être considérée comme résultant de l'union de deux molécules : la méthyl-2 amino-4 aminométhyl-5 pyrimidine (formule II) et le méthyl-β hydroxyéthyl-5 thiazole (formule III) :



- I -



-II-



-III-

La forme active est représentée par la molécule complète sous forme de pyrophosphate.

Depuis longtemps les microbiologistes ont eu l'idée d'étudier les exigences de divers micro-organismes (Bactéries et Champignons) vis-à-vis
- de la molécule de thiamine intacte
- de ses deux "moitiés" mélangées
- et de l'une ou l'autre de ses deux moitiés séparément.

C'est ainsi que ROBBINS, en 1938, a proposé la classification suivante :

	Croissance en présence de :			
	Moitié thiazole seule	*Moitié pyrimidique seule*	*Thiaz. + Pyrim.*	*Thiamine*
I	non	non	non	+
II	non	non	+	+
III	non	+	+	+
IV	+	non	+	+
V	aucun besoin particulier (espèces prototrophes pour la thiamine)			

En se limitant aux Champignons, les travaux de nombreux auteurs, parmi lesquels ODDOUX, ont montré que le cas le plus répandu est celui du groupe III, c'est-à-dire la dépendance vis-à-vis de la moitié pyrimidique seule.. Cela veut dire que la plupart des Champignons réputés thiamine dépendants peuvent en réalité synthétiser la moitié thiazole, puis coupler celle-ci à la moitié pyrimidique d'origine exogène.

Toutefois dans un même groupe les réponses peuvent être très variables. C'est ainsi qu'on peut relever dans les résultats obtenus par ODDOUX que *Hymenochaete rubiginosa*, Aphyllophorale lignicole (comme le *Corticium*), exige la molécule de thiamine entière pour se développer, le mycélium étant coloré en brun-rouge. *Favolus europaeus*, autre Aphyllophorale lignicole, se développe en présence des deux moitiés de la molécule de thiamine. Enfin, toujours dans ce même groupe systématique, *Corticium flavescens* ne manifeste aucune exigence particulière.

Notre expérimentation a été menée comme les précédentes sur milieu gélosé. Chaque "moitié" a été introduite à une concentration égale à celle qu'aurait apporté la thiamine à la dose de 4.10^{-1} mg/l (valeur retenue d'après les résultats antérieurs).

Nous avons pris soin de distiller la fraction thiazolique extemporanément en raison de sa mauvaise conservation.

Les précautions concernant la préparation des divers milieux et leur stérilisation sont les mêmes que dans les expériences précédentes.

Résultats et discussion.

La figure 7 montre que *C. caeruleum* se situe dans le groupe III de la classification de ROBBINS, puisqu'il requiert pour sa croissance la présence de la moitié pyrimidique préformée.

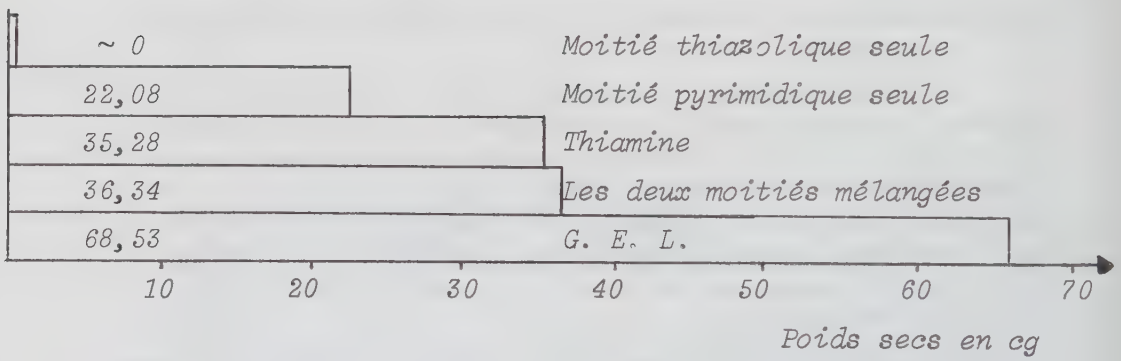


Fig. 7 - Influence sur la croissance des fractions thiazolique et pyrimidique de la thiamine.

En ce qui concerne l'action sur la pigmentogenèse, il apparaît nettement (figure 8) que la fraction thiazolique seule ne peut assurer l'élaboration du pigment bleu, contrairement à la moitié pyrimidique. (Rappelons que dans la mesure des diamètres des colonies n'entre pas la notion d'épaisseur du mycélium.

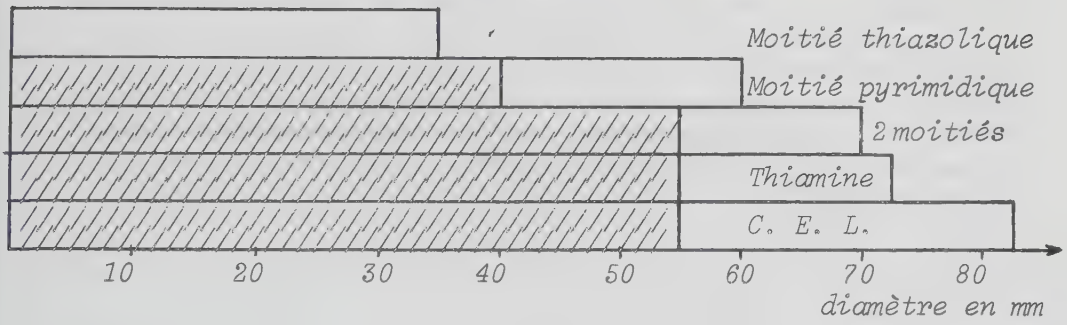


Fig. 8 - Influence sur la pigmentogenèse des fractions thiazolique et pyrimidique de la thiamine.

On observe, comme pour la croissance, une identité d'action entre la thiamine et le mélange de ses deux moitiés. Si le diamètre du témoin sans vitamines peut être mesuré, notons qu'il s'agit d'un mycélium constitué de longs filaments formant un ensemble très ténu, dont le poids est négligeable.

On remarquera que les deux moitiés mélangées sont plus actives que la fraction indispensable seule. Cela peut trouver une explication dans le fait que dans le premier cas le Champignon effectue seulement l'union des deux fragments de la molécule de thiamine, tandis que dans le second cas, il lui faut d'abord synthétiser la fraction manquante avant de procéder à cette copulation. Ceci peut entraîner un léger décalage sur le temps de croissance, décalage qui se répercute sur le résultat. COCHRANE rapporte d'ailleurs que plusieurs auteurs ont noté ce phénomène (BHARGHAVA, 1946, ROBBINS, 1943, SCHOPFER, 1943, entre autres).

Parmi les Aphyllophorales étudiées par ODDOUX, une seule, rappelons le, appartenait au genre *Corticium* ; il s'agit de *C.flavescens* qui prend place dans le groupe V de ROBBINS. *C.caeruleum*, nous venons de le voir, se situe dans le groupe III. On observe ainsi que deux Champignons appartenant au même genre n'ont pas les mêmes exigences vis-à-vis de la thiamine. On retrouve parmi les souches cultivées par ODDOUX le même phénomène pour deux Champignons appartenant au genre *Mycena* : *M.amicta* exige pour croître la fraction pyrimidique, tandis que *M.niveipes* se développe en l'absence de thiamine ou de ses constituants. Le comportement de *C.caeruleum* rejoint donc ici la conclusion tirée par ODDOUX de ses recherches : "Il semblerait en définitive que ces besoins en facteurs de croissance, ne soient, dans beaucoup de cas, que des caractères d'espèces et peut être même de races".

DEUXIEME PARTIE

*

RECHERCHES SUR LES PROPRIÉTÉS ET LA NATURE CHIMIQUE DU PIGMENT

Les études sur la pigmentogenèse rapportées dans les chapitres précédents débouchaient naturellement sur le problème de la nature chimique du pigment de *Corticium caeruleum*.

Très consciente des difficultés vraisemblables d'une telle recherche (difficultés que laissaient entrevoir certaines observations élémentaires des extraits pigmentaires), c'est avec beaucoup de prudence que nous l'avons abordée. Ce travail s'est effectivement révélé très difficile, et le problème n'a pas été pleinement résolu.

Néanmoins, nous avons pu réunir un ensemble de résultats qui permettent d'émettre une hypothèse vraisemblable, et qui pourront servir de point de départ à une recherche plus approfondie.

C H A P I T R E I

ÉTUDE GÉNÉRALE

Avant même d'aborder l'essai de purification du pigment, plusieurs caractéristiques de celui-ci peuvent être mises en évidence.

I - LOCALISATION DU PIGMENT.

Elle est signalée par BOIDIN comme étant "membranaire" (il faut entendre : au niveau de la *paroi*, le terme de membranes devrait être réservé aujourd'hui aux diverses "membranes plasmiques"). Nous avons pu, sans trop de difficultés, vérifier ce fait.

A l'examen microscopique, les filaments mycéliens se présentent sous plusieurs aspects, en rapport vraisemblablement avec leur stade de développement (fig. 9) :

- les uns portent au niveau de la paroi des granulations bleues de diamètre et d'épaisseur variables, faisant plus ou moins saillie du côté externe (fig. 9 a). Le pigment bleu est également localisé plus particulièrement au niveau des boucles.
- d'autres ont une teinte bleue uniforme sur toute la longueur en montrant une couleur bleue plus accentuée sur la cloison des boucles, comme précédemment (fig. 9 b).

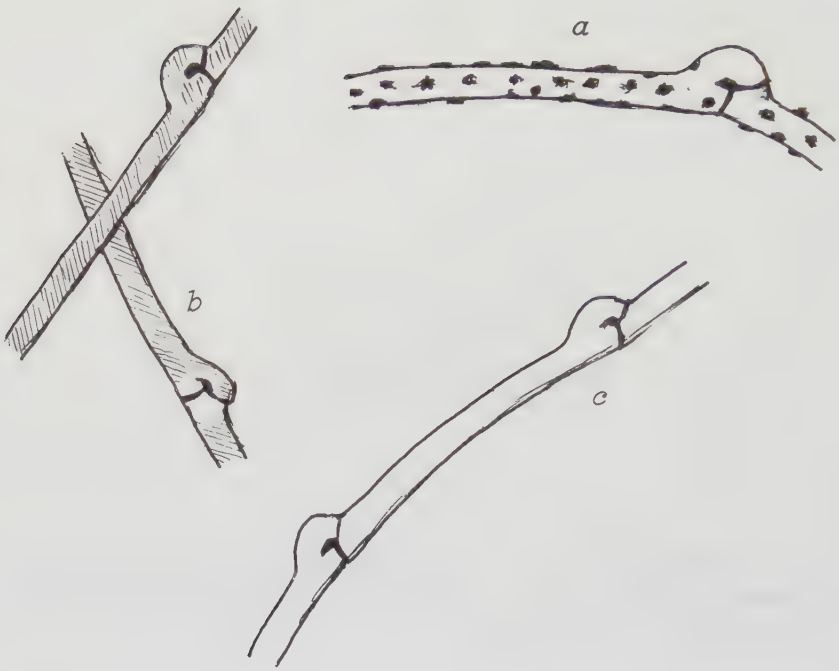


Fig. 9 - Schéma du mycélium de Corticium caeruleum *tel qu'il apparaît au microscope photonique.*

a) hyphe portant des granulations bleues
b) hyphes dont la paroi présente une teinte bleue uniforme
c) hyphe entièrement incolore.

- enfin, les filaments jeunes sont entièrement blancs (fig. 9 c). On peut dire qu'il s'agit de filaments jeunes car, d'une part, on peut les suivre jusqu'à leur extrémité et, d'autre part, ce sont eux qui constituent la presque totalité des prélèvements effectués à la périphérie des cultures, là où le mycélium, encore blanc, continue à s'étendre sur son support.

Il faut rapprocher de ce dernier aspect celui des filaments prélevés sur des cultures obtenues à l'obscurité, dont le mycélium est blanc : ces hyphes sont incolores et leur paroi semble lisse.

Nous avons cherché à obtenir confirmation de cette localisation par microscopie électronique.

Les échantillons à examiner sont fixés soit par l'acide osmique, soit par le glutaraldéhyde. Après déshydratation par des alcools de titre croissant, on réalise des inclusions dans de l'épon solubilisé dans de l'oxyde de propylène, par polymérisation de la résine entre 55° et 60° durant 48 heures.

Bien que correspondant à des prélèvements effectués dans des zones bleues, la plupart des clichés obtenus ne montrent aucune formation rappelant les granulations ou le liséré continu observé au microscope photonique. Deux clichés, toutefois, évoquent cet aspect de manière assez convaincante. (Fig. 10 et 11).

Si ces formations sombres sont bien des amas pigmentaires, comme on est tenté de le penser, il faudrait admettre que la plupart des coupes ont intéressé des portions d'hyphes non pigmentées, ou encore que ces formations auraient été éliminées des parois, lors des opérations préliminaires à l'observation.

A l'appui de cette opinion, nous avons observé que le pigment était soluble dans l'oxyde de propylène (utilisé pour l'inclusion dans l'épon).

Une étude plus poussée de cet aspect de la cytologie de *Corticium cæruleum* en microscopie électronique devrait donc mettre en œuvre des procédés de préparation autres que ceux utilisés ici.

Fig. 10 - Coupe d'une hyphe examinée au microscope électronique montrant la présence de granulations externes sur la paroi.

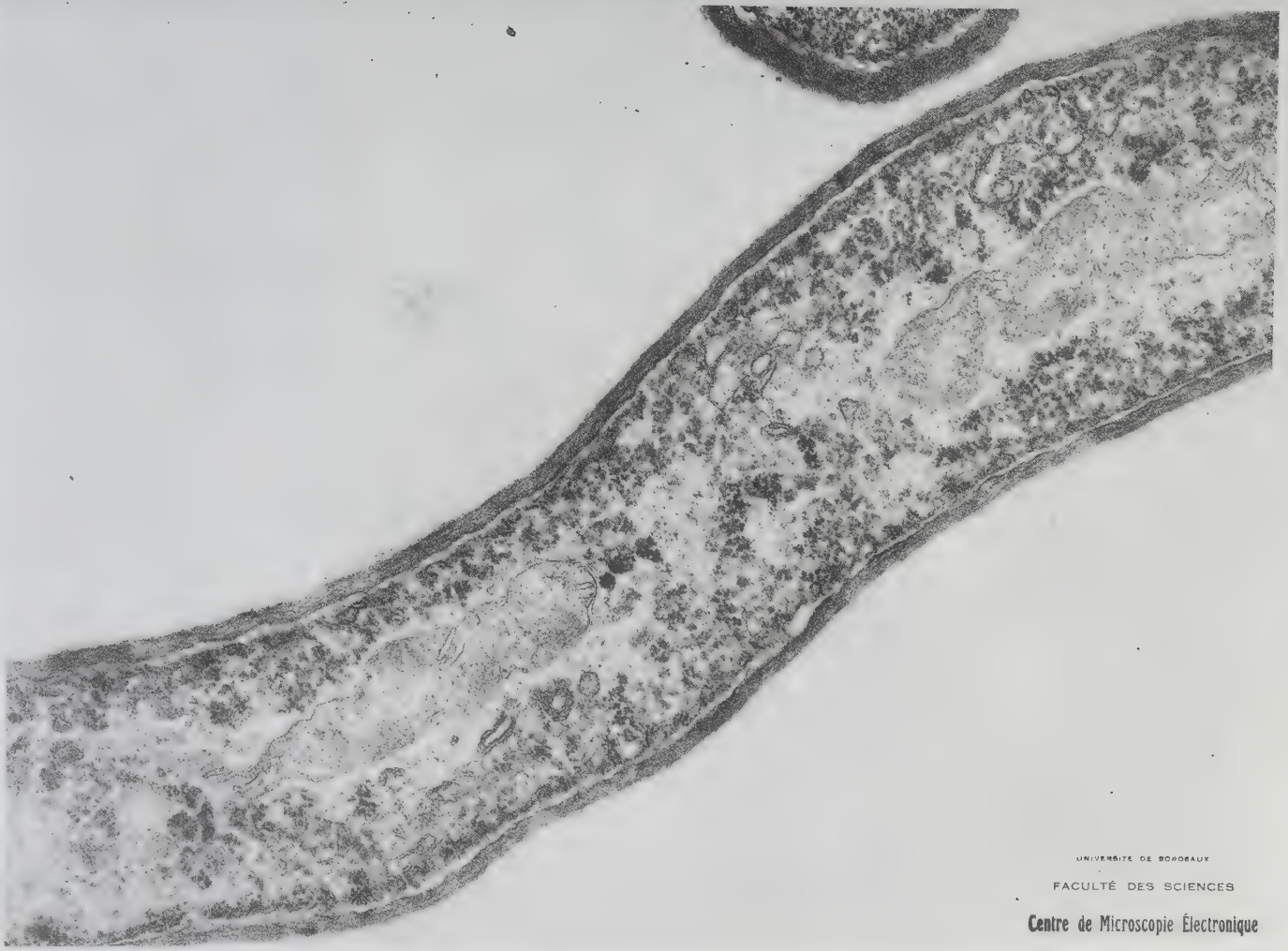


Fig. 11 - Coupe d'une hyphe examinée au microscope électronique dont la paroi présente un liséré continu, sans pigment.

II - ESSAIS D'EXTRACTION ET INSTABILITE DU PIGMENT .

L'instabilité du pigment se manifeste par la tendance des solutions extractives obtenues à se décolorer plus ou moins rapidement selon le solvant utilisé, décoloration qui est accélérée par l'exposition à la lumière . Divers solvants et plusieurs techniques ont été essayés (sur du mycélium frais, sur du mycélium lyophilisé ou simplement séché à l'étude, entier ou plus ou moins divisé , en opérant à chaud ou à froid).

Les résultats observés sont les suivants :

a) Action sur le mycélium frais.

Eau : avec ou sans broyage au mortier, à chaud ou à froid, le pigment est pratiquement insoluble dans l'eau. Des essais de microbroyage ont toutefois permis d'obtenir un liquide très légèrement bleuté.

Ethanol : On obtient à froid une solution bleu-violacé instable qui vire au jaune au bout de quelques heures.

A chaud le liquide extractif a une teinte "pelure d'oignon".

Chloroforme : L'extraction à froid donne de meilleurs résultats. On obtient une solution violet foncé mais

sa stabilité n'est guère de plus longue durée que celle de l'extrait éthanolique.

A chaud on obtient également une solution d'un violet foncé.

Dans ces divers cas, le mycélium n'est que très peu décoloré, la majeure partie du pigment semblant rester *in situ*. En outre la présence d'eau est un facteur qui paraît nuire à la conservation de l'extrait.

b) Action sur le mycélium lyophilisé.

Pour éliminer toute trace d'eau, on lyophilise le mycélium grossièrement découpé en morceaux et on fait agir sur lui divers solvants, immédiatement après l'avoir retiré du lyophilisateur.

Les résultats sont les suivants selon les solvants (10 ml de solvant pour un quart de mycélium):

Solvant	*Couleur de la solution extractive*	*Evolution de la couleur*
Eau Benzène Ether de pétrole	Incolores	
Méthanol	rose pâle	évolution vers le jaune en quelques minutes.
Butanol	violet pâle	
Ether éthylique	rose saumon	
Dioxanne	rouge	évol. vers le rouge vineux
Diméthylformanide Diméthylsulfoxyde	violet	évolution vers le brun puis le jaune
Ethanol	violet	
Acétone	rouge	
Pyridine	violet foncé	évolution vers le vineux puis le jaune
Chloroforme	violet foncé	relativement stable.

Des mesures ont été effectuées au photomètre sur ces solutions pour déterminer celle qui a la plus forte concentration en pigment.

Solvant	*Pourcentage de transmission*
Pyridine	51 p. 100
Ethanol	39 p. 100
Acétone	30 p. 100
Chloroforme	24 p. 100

Ces valeurs montrent déjà que le chloroforme est le solvant le plus efficace. En outre, si l'on conserve ces solutions pendant 24 heures, dans des récipients bouchés en verre inactinique et à +4° C, on constate que, malgré ces précautions, la solution éthanolique et la solution pyridinique sont devenues jaunes, tandis que la solution acétonique a nettement pâli. Seule la solution chloroformique a conservé sa teinte violette, et une nouvelle mesure du pourcentage de transmission donne la valeur de 30 p. 100, peu différente de la valeur initiale.

C'est donc le chloroforme qui, en définitive, se révèle le meilleur solvant pour l'extraction et la conservation du pigment. On observera toutefois que l'extraction est loin d'être totale, le mycélium résiduel étant encore nettement coloré.

Le broyage du mycélium avant la lyophilisation n'améliore pas l'extraction, non plus que l'action de mélanges de solvants (alcool-chloroforme, alcool-acétone, acétone-chloroforme).

c) Action sur le mycélium séché à l'étuve.

Les inconvénients matériels inhérents aux opérations de lyophilisation (longue durée, impossibilité de traiter un grand nombre de mycéliums à la fois) nous ont incitée à essayer le simple séchage à l'étuve des mycéliums préalablement essorés entre plusieurs feuilles de papier filtre ; la température était de 40° C.

Sur un tel matériel, l'extraction chloroformique donne des résultats comparables à ceux observés avec le matériel lyophilisé. On peut même opérer à température d'ébullition du solvant, à condition de ne pas prolonger celle-ci trop longtemps (l'utilisation du Soxhlet est, pour cette raison, à proscrire).

C'est à partir de ces constations qu'a été codifiée la technique d'extraction.

III- TECHNIQUE D'EXTRACTION DU PIGMENT BRUT.

Les observations précédentes montrent à l'évidence que le meilleur procédé d'extraction sera en réalité le moins mauvais, tant sont multiples les causes d'altération du pigment. Nous avons finalement retenu le protocole suivant.

Le Champignon est cultivé sur milieu G.E.L. classique, gélosé, à la surface duquel on dispose une rondelle de cellophane stérile avant de placer l'inoculum. Ce procédé permet au mycélium de se développer normalement et d'être ensuite aisément séparé à la fois du milieu de culture et de la cellophane à laquelle il n'adhère par fortement. Ceci résoud le problème de l'élimination de la gélose.

Les mycéliums sont, après séparation, mis à sécher quelques heures à l'étuve à une température n'excédant pas 40° C. Ils sont alors traités, après avoir été réduits en petis morceaux, pendant 5 minutes par du chloroforme bouillant à reflux, dans la proportion de 8 mycéliums pour 400 ml de chloroforme. La solution extractive est immédiatement refroidie et filtrée, puis évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. L'extrait sec se conserve mieux que la solution.

Une variante consiste à laisser la solution s'évaporer spontanément à l'air, dans une capsule, après l'avoir concentrée à l'évaporateur rotatif.

IV- FACTEURS DE L'INSTABILITE DU PIGMENT BRUT.

Ils sont sans doute multiples, mais on peut essayer d'en individualiser certains.

a) Action de la lumière.

Après avoir constaté que les solutions de pigment conservées à l'obscurité, ou dans des récipients en verre inactinique, gardaient plus longtemps leur teinte initiale, des essais ont été faits pour connaître le rôle que jouent

l'intensité et la longueur d'onde des rayons lumineux dans le phénomène de "dégradation".

Ces expériences sont réalisées sur un extrait alcoolique de pigment placé en couche mince dans le fond de boîtes de Petri que l'on recouvre des filtres colorés Kodak et des filtres neutres Kodak Wratten déjà utilisés lors des essais sur le Champignon lui-même (Cf. Chapitre "Pigmentogenèse et lumière" p. 21). La solution témoin est exposée directement à la lumière.

Après huit heures d'exposition de l'ensemble à la lumière du jour on obtient les résultats suivants :

- Témoin : une diminution de l'intensité de la coloration est appréciable visuellement au bout d'une vingtaine de minutes.
- Filtres neutres : une modification de teinte est sensible après quatre heures, plus ou moins accentuée selon le pourcentage de transmission des filtres. Seul le filtre ND 2, qui ne laisse passer que 1 p. 100 de l'énergie lumineuse émise par la source donne une conservation de l'aspect initial au-delà de huit heures.
- Filtres colorés : seule la solution placée sous le filtre 70 (rouge foncé) a gardé sa teinte violette au bout de huit heures ; or, ce filtre ne laisse passer que les radiations de longueurs d'onde supérieures à 650 nm, avec un pourcentage de transmission de 100 p. 100 à partir de 700 mn. Il arrête donc la quasi totalité du rayonnement émis par la source.

b) Phénomènes d'oxydo-réduction.

L'instabilité manifestée par le pigment brut dans la plupart des solvants, avec toujours évolution de sa teinte vers un pâlissement, nous a suggéré qu'il pouvait peut-être s'agir d'une réduction génératrice d'un leuco-dérivé. Les observations suivantes viennent à l'appui de cette théorie.

1) *in vitro.*

Un extrait alcoolique de pigment brut fraîchement préparé se décolore instantanément par addition de dithionite de sodium. Il est possible de faire réapparaître la coloration violacée en ajoutant quelques gouttes d'une solution diluée de chlorure ferrique, ou de permanganate de potassium (dans des conditions telles, évidemment, que la coloration propre de ce réactif n'intervienne pas).

On peut alors se demander si la décoloration spontanée du pigment dans les liquides à pouvoir dissolvant étendu (tels que l'acétone, la pyridine, le diméthylformamide, etc) ne résulte pas de la présence de composés réducteurs, extraits du mycélium par le solvant en même temps que le pigment, ou présents à l'état de traces dans le solvant lui-même (voir p. 72).

Effectivement, de telles solutions ayant spontanément pâli ou jauni, récupèrent leur teinte violette initiale par addition de quelques gouttes de permanganate de potassium à 1 p.100 ou d'eau oxygénée.

2) *in vivo.*

Une des premières constatations provient des cultures statiques en milieu liquide, sur lesquelles on remarque que le mycélium submergé reste blanc et que seules commencent à bleuir les parties superficielles qui sont en contact avec l'air. Mais les expériences suivantes sont plus probantes.

a) des cultures sur milieu G.E.L. gélosé sont réalisées dans des boîtes de Petri rendues étanches au moyen de paraffine et placées sous une rampe lumineuse ; un mycélium se développe autour de l'inoculum, parallèlement à celui de cultures-témoins dans des boîtes non hermétiques. On constate que les cultures placées en anaérobiose (anaérobiose relative, en raison de l'existence d'air dans les boîtes lors de leur fermeture) présentent un bleuissement nettement inférieur à celui du témoin.

b) des cultures bleues jeunes sur gélose, réalisées dans les conditions normales, sont retournées de telle manière

que le mycélium vienne s'appliquer sur le fond de la boîte de Petri et se trouve recouvert par la gélose. Quelques jours plus tard, on observe que le mycélium s'est décoloré.

Si l'on remet alors l'ensemble mycélium-gélose dans sa position primitive, il y a recoloration du mycélium en moins d'une heure.

c) on peut aussi recouvrir d'une couche d'huile de paraffine une culture dont le mycélium est devenu bleu dans des conditions normales. On observe la décoloration du mycélium au bout de 24 heures environ. Quand on retire l'huile de paraffine il y a recoloration en quelques minutes, recoloration que l'on peut accélérer en éliminant le reste d'huile par un lavage à l'éther de pétrole, éliminé immédiatement à son tour par évaporation rapide.

En trente minutes la colonie a retrouvé totalement sa couleur bleue primitive.

d) un mycélium bleu est immergé dans de l'eau ; l'addition de dithionite de sodium le décolore immédiatement. Le mycélium est lavé plusieurs fois, remis en suspension dans l'eau ; l'addition de permanganate de potassium provoque une recoloration instantannée.

Il faut noter que ces phénomènes d'oxydo-réduction *in vivo* ne peuvent être observés que sur des cultures assez jeunes, c'est-à-dire n'ayant pas encore bleui sur toute leur surface. A partir du moment où la culture a recouvert toute la surface du milieu dans la boîte de Petri et où le mycélium est totalement bleu, il n'est plus possible de le décolorer par anaérobiose.

En revanche, la décoloration par un réducteur est encore réalisable ; il suffit d'immerger le mycélium dans de l'eau et d'ajouter un peu de dithionite de sodium : la décoloration est très rapide et peut réverser sous l'action du permanganate de potassium.

On peut donc conclure que, même avec les hyphes âgées, le pigment conserve son caractère oxydo-réducteur ; s'il ne se décolore pas *in vivo* en anaérobiose, c'est donc que le métabolisme des mycéliums âgés n'est plus suffisamment actif pour fournir les équivalents réducteurs nécessaires à la réaction.

Il est tentant de penser que le pigment bleu de *Corticium caeruleum* joue un rôle dans les oxydo-réductions cellulaires de ce Champignon ; le fait qu'il se décolore en anaérobiose montre qu'il se comporte comme un accepteur d'électrons lorsque l'oxygène n'est plus disponible. Pour préciser la portée physiologique de cette aptitude, il faudrait pouvoir bloquer à différents niveaux le fonctionnement de la chaîne respiratoire du Champignon, ce qu'il ne nous a pas été possible d'envisager dans le cadre de ce travail.

En revanche nous avons pu situer la valeur du potentiel d'oxydo-réduction du pigment par rapport à celle de systèmes de référence. A cette fin, des fragments de mycélium bleu ont été immergés dans des solutions de réducteurs. Nous avons constaté ainsi que le système pigment-leucodérivé s'intercale entre le système ferricyanure-ferrocyanure (+ 0,36 mV) et le système sulfite-thiosulfate (+ 0,40 mV).

c) Influence de pH.

Des tentatives d'extraction du pigment par de l'éthanol acidifié ou alcalinisé ont fait apparaître le rôle du pH sur la stabilité du composé.

Pour le préciser, on peut opérer sur un extrait alcoolique fraîchement préparé de pigment. La stabilité de la solution alcoolique est suffisante pour se prêter à des réactions si on les effectue immédiatement après l'extraction.

Par alcalinisation de l'extrait alcoolique la solution prend une teinte jaune. Par acidification il ne se produit aucun changement, mais l'addition d'acide ne prolonge pas la durée de conservation par rapport à un témoin non acidifié.

Un essai d'évaluation au pH-mètre a été tenté pour étudier la réversibilité éventuelle du phénomène. Les "nombres" indiqués par le pH-mètre sont fonction du potentiel de l'électrode de verre par rapport à l'électrode de référence, mais ils n'ont pas la signification physico-chimique du pH déterminé dans l'eau, cependant ils permettent de suivre le phénomène et ils ont donc un intérêt relatif et permettent de voir en particulier qu'il existe un équilibre réversible tant que l'alcalinité n'est pas trop élevée.

L'acidification et l'alcalinisation se font au moyen de HCl 0,01 N et NaOH 0,01 N.

Au début de l'expérience le liquide alcoolique contenant le pigment est bleu-violacé. La valeur indiquée par le pH-mètre est 6,2.

Par addition d'hydroxyde de sodium la solution vire peu à peu au bleu-vert (10,55) puis au vert (12,3). A ce stade une addition d'acide chlorhydrique permet de revenir vers la teinte initiale (début de réversibilité apparaissant vers 10). Quand on pousse plus loin l'alcalinisation, la couleur passe du vert au vert-jaune, au jaune, puis au jaune-marron (12,85) et, à ce stade, l'addition, même massive, d'acide chlorhydrique ne permet pas la réversibilité.

On peut ainsi à plusieurs reprises faire passer la teinte de la solution du vert au bleu-violacé et inversement. Mais il faut ajouter qu'à chaque retour vers la teinte violette à partir du vert, la couleur obtenue n'est pas identique au violet de départ. Il faut aussi tenir compte de l'instabilité avec le temps du pigment en solution alcoolique.

C H A P I T R E II

PURIFICATION ET ÉTUDE DU PIGMENT

I - PURIFICATION.

La relative stabilité de l'extrait chloroformique brut obtenue comme il vient d'être exposé dans le chapitre précédent, nous a incitée à tenter la purification du pigment.

1) Chromatographie de l'extrait brut.

Parmi les différents adsorbants essayés, plusieurs ont conduit à des résultats médiocres ou franchement mauvais : alumine (fixation irréversible), papier, couche de cellulose (mauvaise séparation, traînées). Les chromatographies les mieux lisibles ont été obtenues sur couche mince de gel de silice (Kieselgel G de Merck) avec, comme solvant élutif, du chloroforme pur.

Quand on examine la plaque immédiatement après l'avoir retirée de la cuve à chromatographie, on observe quatre taches qui, en partant du spot initial, se présentent ainsi :

1- une tache gris-bleu juste au-dessus du spot de départ
2- une tache jaune-ocre de Rf 0,11
3- une traînée violette
4- une tache importante de teinte gris-bleu à violacée, pour Rf de 0,5

Puis on voit apparaître progressivement, à un Rf de l'ordre de 0,7, une tache bleue dont la coloration s'accentue et atteint un maximum d'intensité en quelques minutes, tandis qu'elle se cerne peu à peu d'un liséré violet (5). Avec le temps, elle devient totalement violette, puis pâlit et disparaît au bout de quelques heures.

Eluée par le chloroforme quand elle est à son maximum de coloration, cette tache donne un liquide bleu-violacé, instable à la lumière. Cette élution n'est d'ailleurs pas totale, une partie du produit restant fixéesur le gel de silice.

L'aspect de la chromatographie est résumé dans la figure 12.

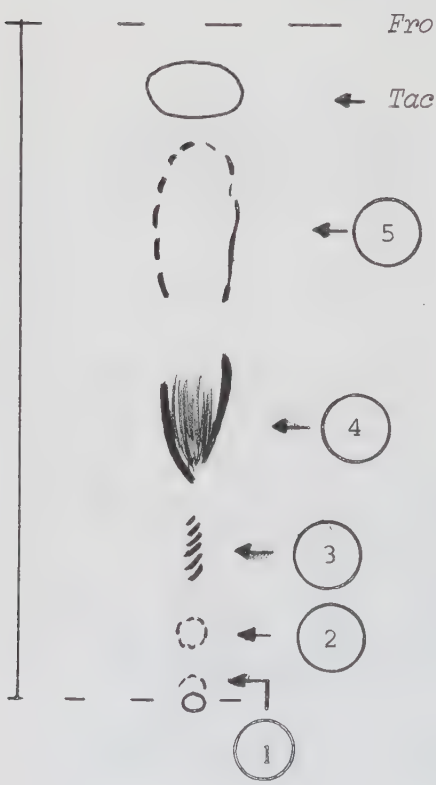


Fig. 12 - Schéma d'un chromatogramme en couche mince de l'extrait brut du pigment.

Pour confirmer le rôle joué par la lumière comme révélateur de la tache n° 5, nous avons effectué simultanément plusieurs chromatographies en couche mince à l'obscurité ; au terme de la migration du solvant, toutes les plaques sont extraites des cuves. Les unes sont exposées aussitôt à la lumière et, dès qu'elles sont sèches, elles donnent lieu à l'apparition de la tache bleue selon le processus qui vient d'être décrit. D'autres plaques sont mises à sécher à l'obscurité, où on les laisse séjourner plus d'une heure ; lorsqu'on les expose ultérieurement à la lumière, on constate que la tache bleue ne s'est pas formée, mais qu'elle apparaît dans les minutes qui suivent.

Il s'agit très vraisemblablement de la photo-oxydation d'un leuco-dérivé.

Si l'on replace ensuite les plaques à l'obscurité, la tache n° 5 (devenue violette) est encore visible 24 h. plus tard ; si, au contraire, les plaques sont laissées à la lumière, les diverses taches disparaissent en quelques heures.

Des chromatographies bidimensionnelles n'ont pas apporté d'éléments supplémentaires, et n'on fait que confirmer la complexité de l'extrait brut et l'instabilité de ses constituants.

Différents réactifs de révélation ont été pulvérisés sur les chromatoplaques, sans résultat notable, sauf pour la benzidine diazotée (1) (réactif des phénols et des amines aromatiques) qui fait apparaître une tache rouge intense pour un Rf voisin de zéro.

2) Le composé cristallisé phénolique.

Si l'on soumet à une évaporation lente, après concentration à l'évaporateur rotatif, un extrait chloroformique brut de pigment, on constate que le résidu sec renferme, plus ou moins englués dans la masse bleue amorphe, des cris-

(1) Mélange extemporané des deux solutions suivantes :
- Benzidine à 0,5 p. 100 en milieu chlorhydrique
- Nitrite de sodium à 1 p. 100.

taux en aiguille qui, examinés à la loupe, apparaissent incolores. Ces cristaux étant nettement plus solubles dans le méthanol que le pigment qui les accompagne, on peut par des reprises et des évaporations successives suivies d'une cristallisation fractionnée, obtenir une quantité appréciable d'un composé qui fond à 118° C.

La solution méthanolique de ce composé a été étudiée par chromatographie sur couche mince de gel de silice, les plaques étant ultérieurement traitées par différents réactifs de révélation. Seule la benzidine diazotée donne une réaction nette ; le meilleur système élutif s'est révélé être un mélange chloroforme-méthanol (9:1 v/v), qui donne un Rf de 0,6.

D'autres réactifs des phénols ont été essayés sur les chromatoplaques, avec des résultats positifs :

- le permanganate de potassium alcalin (solution de $KMnO_4$ alcalinisée par $Na_2\ CO_3$) : tache jaune.
- le dipyridyle - 2,2' en solution méthanolique à 0,5 p. 100 après pulvérisation préalable de $FeCl_3$ en solution aqueuse à 0,5 p. 100 : tache brune.
- le ferricyanure de potassium à 5 p. 100 après pulvérisation de $FeCl_3$ à 5 p. 100 : tache bleue.

Toutes ces réactions sont en faveur de la nature phénolique du composé cristallisé. Il s'agit d'un composé ternaire (C,H,O), la recherche de l'azote et celle du soufre ayant été négatives.

Recherche de l'azote : Le composé sec est mélangé à parties égales dans un petit tube avec du carbonate de potassium et du magnésium en poudre. On chauffe au rouge, la réduction s'opère, et on brise le tube chaud dans quelques millilitres d'eau distillée. On filtre.

Une partie du filtrat, additionnée de quelques cristaux de sulfate ferreux est portée à ébullition un certain temps en agitant le tube pour oxyder une partie des ions Fe^{++} en ions Fe^{+++}. On refroidit et on ajoute de l'acide chlorhydrique dilué. Il n'y a pas formation de bleu de Prusse qui se serait produite en présence d'azote.

Recherche du soufre : Elle est effectuée sur l'autre partie du filtrat obtenue précédemment divisée en deux fractions.

- la première fraction additionnée d'une solution de nitroprussiate de sodium à 5 p. 100 ne donne pas la coloration violacée dûe à l'ion S^{--}.
- la seconde fraction ne précipite pas à l'ébullition en présence de sulfate ferreux.

Nous n'avons pas cherché à approfondir l'étude chimique de ce composé phénolique ; celle-ci aurait requis une quantité plus importante de produit impliquant une technique de purification plus efficace, quant à son rendement, que la cristallisation fractionnée.

Ces problèmes, qui constituent l'un des thèmes de travail d'un autre chercheur de notre équipe sont actuellement pratiquement résolus.

3) Le pigment purifié.

La solubilité dans le méthanol du métabolite phénolique permet d'éliminer ce dernier du résidu pigmentaire obtenu par évaporation de l'extrait chloroformique brut, ceci au prix de la perte d'une certaine quantité de pigment entraînée par le méthanol. On peut parfaire cette purification en faisant agir l'eau pour éliminer les composés hydrosolubles éventuellement présents, et l'éther de pétrole pour dissoudre les impuretés lipidiques extraites par le chloroforme.

Le protocole retenu est le suivant. Le résidu sec résultant de l'évaporation de l'extrait chloroformique brut est délayé dans un large excès de méthanol et l'on filtre sur verre fritté, qui retient la fraction insoluble ; celle-ci est lavée à plusieurs reprises après évaporation du méthanol par de l'éther de pétrole, puis séchée sous vide en présence de P_2O_5. La poudre séchée est alors soumise à plusieurs lavages par de l'eau distillée, puis par le méthanol et séchée à nouveau. On vérifie par chromatographie en couche mince qu'elle ne renferme plus de composé phénolique. C'est cette poudre qui constitue ce que nous appellerons le "pigment purifié". Le rendement est de l'ordre de 1 p. 100.

II - ETUDE DU PIGMENT PURIFIE

Le pigment purifié se présente sous l'aspect d'une poudre non hygroscopique, de couleur bleu foncé, paraissant amorphe à l'examen microscopique.

I - SOLUBILITE.

Le pigment purifié est insoluble dans l'eau, les hydrocarbures, le tétrachlorure de carbone.

Il est peu soluble dans le méthanol, l'éthanol, l'acétone.

Le chloroforme, le dioxanne, l'acétonitrile dissolvent la plus grande partie du pigment, laissant toutefois un résidu insoluble.

Les solvants les plus efficaces sont la pyridine et surtout le diméthylformamide.

Il est à noter que le comportement du pigment purifié dans ces différents solvants quant à sa coloration et à la stabilité de celle-ci est le même que pour le pigment brut (voir p. 72), et c'est encore le chloroforme qui offre le meilleur compromis entre le pouvoir dissolvant et la stabilité de la solution.

La pyridine représente un cas particulier. Si l'on utilise le produit du commerce, la solution de pigment vire rapidement du violet au jaune très pâle, en revanche, la pyridine rectifiée permet de conserver la couleur pendant plusieurs heures. Ceci est à rattacher aux phénomènes d'oxydoréduction (voir p. 75).

II - COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE.

Sur plaque de gel de silice, avec pour système élutif le mélange chloroforme-méthanol 9:1 (v/v), on observe un spot unique, violet, de Rf voisin de 0,6, suivi d'une légère traînée de même couleur. Il n'y a pas de substances fluo-

rescentes ni de composés phénoliques (pas de réaction avec les réactifs mentionnés plus haut).

On n'observe plus le phénomène de la tache bleue apparaissant à la lumière sur la chromatoplaque.

III - ETUDE SPECTROSCOPIQUE.

a) dans le visible (solution chloroformique)

Fig. 13 - Spectre visible du pigment purifié en solution chloroformique.

b) dans l'ultra-violet.

Dans le méthanol, l'alcool à 95°, le dioxanne, l'acétonitrile (1), le pigment purifié présente le même spectre d'absorption :

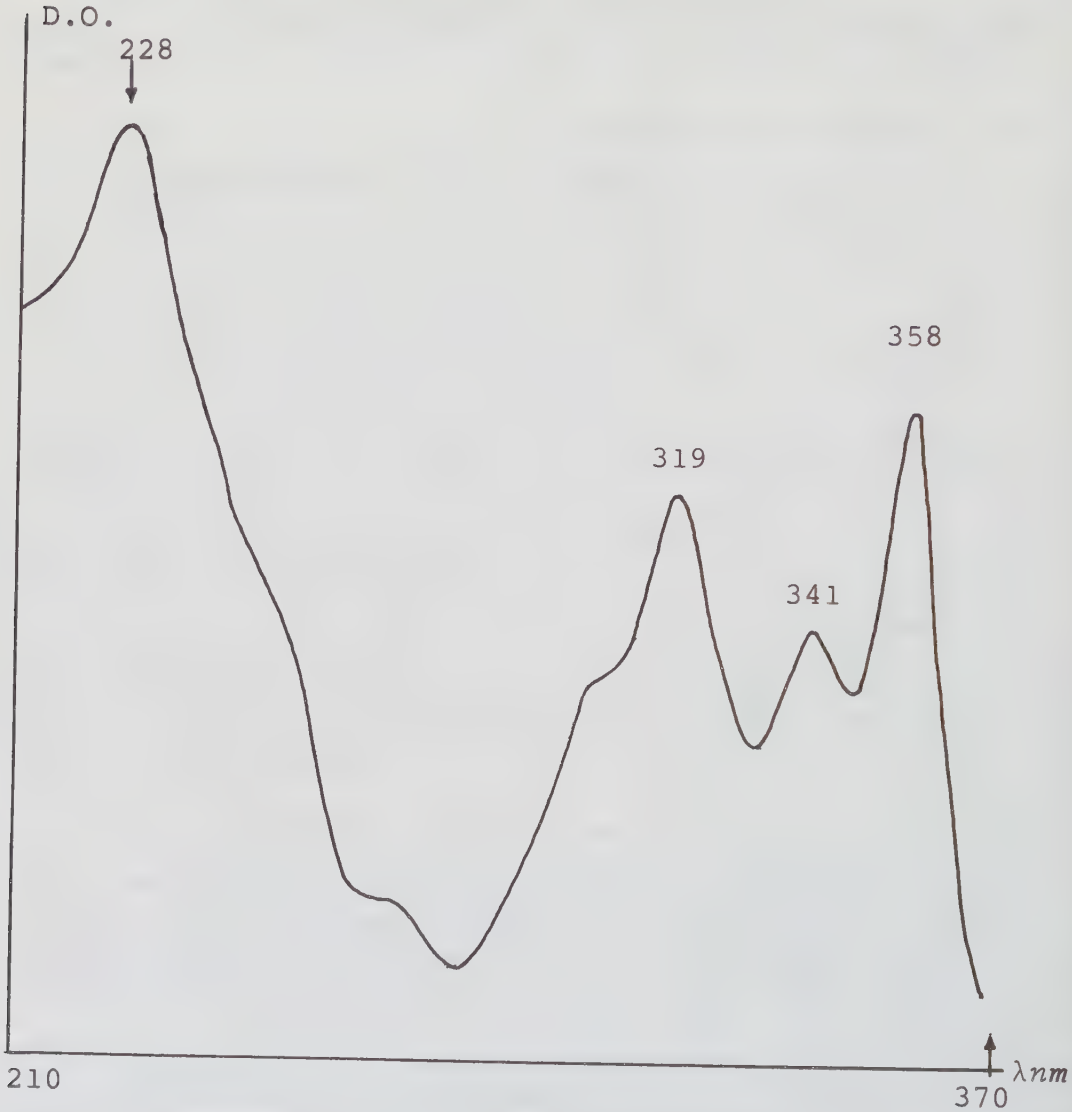


Fig. 14 - Spectre ultra-violet du pigment purifié en solution dans l'éthanol.

(1) avec le dioxanne et l'acétonitrile, les spectres ont été enregistrés à partir de 250 nm.
le spectrophotomètre est un Unicam SP 1800.

En revanche la solution chloroformique donne lieu à un spectre sensiblement différent :

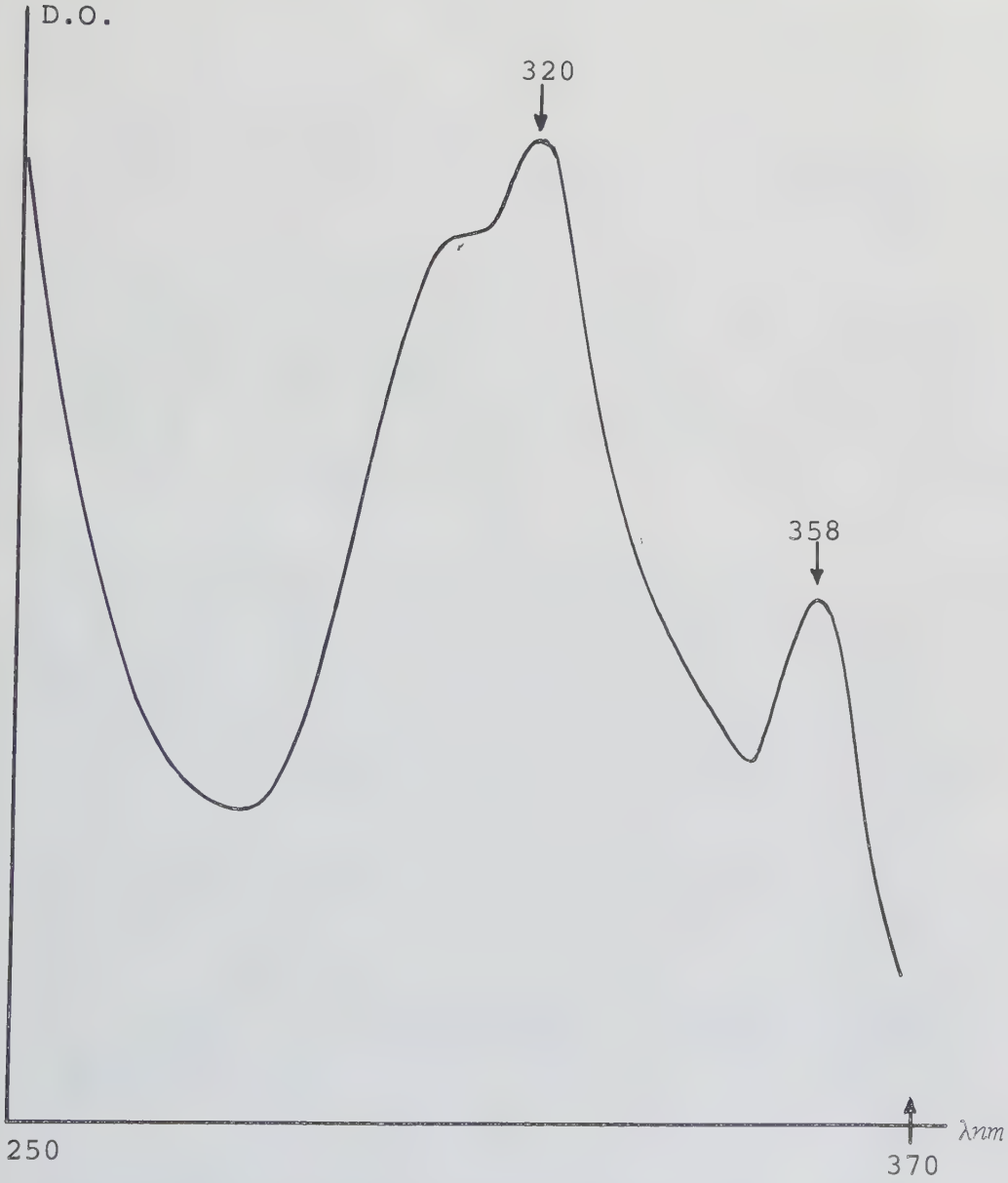


Fig. 15 - Spectre ultra-violet du pigment purifié en solution chloroformique.

Cette différence, que nous n'avons pu expliquer pendant un certain temps, s'interprète aisément par un phénomène d'oxydo-réduction, comme on va le voir ci-après.

IV - PHENOMENES D'OXYDO-REDUCTION.

Le pigment purifié présente les mêmes propriétés oxydo-réductrices que le pigment brut. Une solution méthanolique, décolorée par le dithionite de sodium, se recolore par addition de $KMnO_4$ ou de $FeCl_3$ en solution diluée, ou par l'eau oxygénée.

Le jaunissement, voire la décoloration, du pigment purifié dans la pyridine du commerce est à rapporter à une réduction provoquée par les impuretés du solvant ; il suffit en effet d'utiliser de la pyridine récemment rectifiée pour voir la coloration se maintenir durant plusieurs heures, alors que la solution témoin réalisée avec de la pyridine ordinaire se décolore en une dizaine de minutes. (1)

Voulant étudier l'influence de la réduction sur l'allure du spectre U.V., nous nous sommes adressée aux solutions de pigment dans des solvants susceptibles de dissoudre un peu de dithionite de sodium (au prix de l'addition, si nécessaire, d'une petite quantité d'eau) : méthanol, éthanol, dioxanne. A notre surprise, ces solutions, *même décolorées par réduction*, présentent encore le spectre caractéristique de la figure 14. (seules les intensités relatives des pics à 319 et 357 nm sont légèrement modifiées).

Force est donc d'admettre que les solutions pigmentaires dans les solvants précités présentent, *malgré leur coloration*, le spectre prédominant du leuco-dérivé ; tout se passe comme si, dans ces solvants, s'instaurait un équilibre favorable à la forme réduite, et défavorable à la forme oxydée, celle-ci étant toutefois à une concentration suffisante pour conférer au liquide une coloration visible à l'oeil (sans doute en raison du pouvoir colorant intense du pigment).

(1) *Au contraire l'utilisation de la pyridine rectifiée n'améliore pas la conservation du pigment* brut *(voir p. 72) car les substances réductrices sont alors apportées par le pigment lui-même (peut-être s'agit-il du phénol ?).*

Dès lors, on pouvait se demander si le spectre particulier donné par la solution chloroformique ne correspondait pas à la forme *oxydée*, celle-ci étant, pour une raison ou pour une autre, plus soluble dans le chloroforme que dans les autres solvants.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons essayé de réaliser une réduction *progressive* de la solution chloroformique, avec enregistrement immédiat du spectre d'absorption. Il est possible d'y parvenir en agitant plus ou moins énergiquement une solution chloroformique de pigment au contact d'une solution aqueuse de dithionite de sodium ; cette opération peut être réalisée dans la cuve même du spectrophotomètre et, moyennant quelques tâtonnements, on peut trouver des concentrations et des réglages tels que la totalité du spectre (de 250 à 600 nm) s'inscrive sur le même enregistrement.

Le résultat corrobore tout à fait l'hypothèse avancée plus haut d'un équilibre favorable à la forme réduite. Dès la première "agitation réductrice", on voit apparaître (fig. 16) le spectre de la forme réduite, *alors que le liquide chloroformique est encore fortement coloré en bleu-violet*. Mieux : les courbes correspondant aux différents degrés d'oxydo-réduction passent toutes par le même point isosbestique (1), ce qui établit de manière irréfutable le passage progressif de la ou des formes oxydées (spectre n° 1) à l'état réduit (spectre n° 3) : le spectre intermédiaire n° 2) correspond à un stade transitoire c'est-à-dire à une quantité décroissante de la forme oxydée en présence de quantité croissante de la forme réduite (la quantité totale de ces deux formes étant bien entendu nécessairement constante).

Nous avons essayé, sans succès, d'oxyder le pigment à un degré plus élevé que celui qu'il présente dans le chloroforme ; il paraît donc s'y trouver à son degré d'oxydation maximal.

(1) On sait que lorsqu'un composé présente deux formes A et B en équilibre, les différents états de cet équilibre présentent des spectres d'absorption dont les courbes passent par un même point, dit point isosbestique.

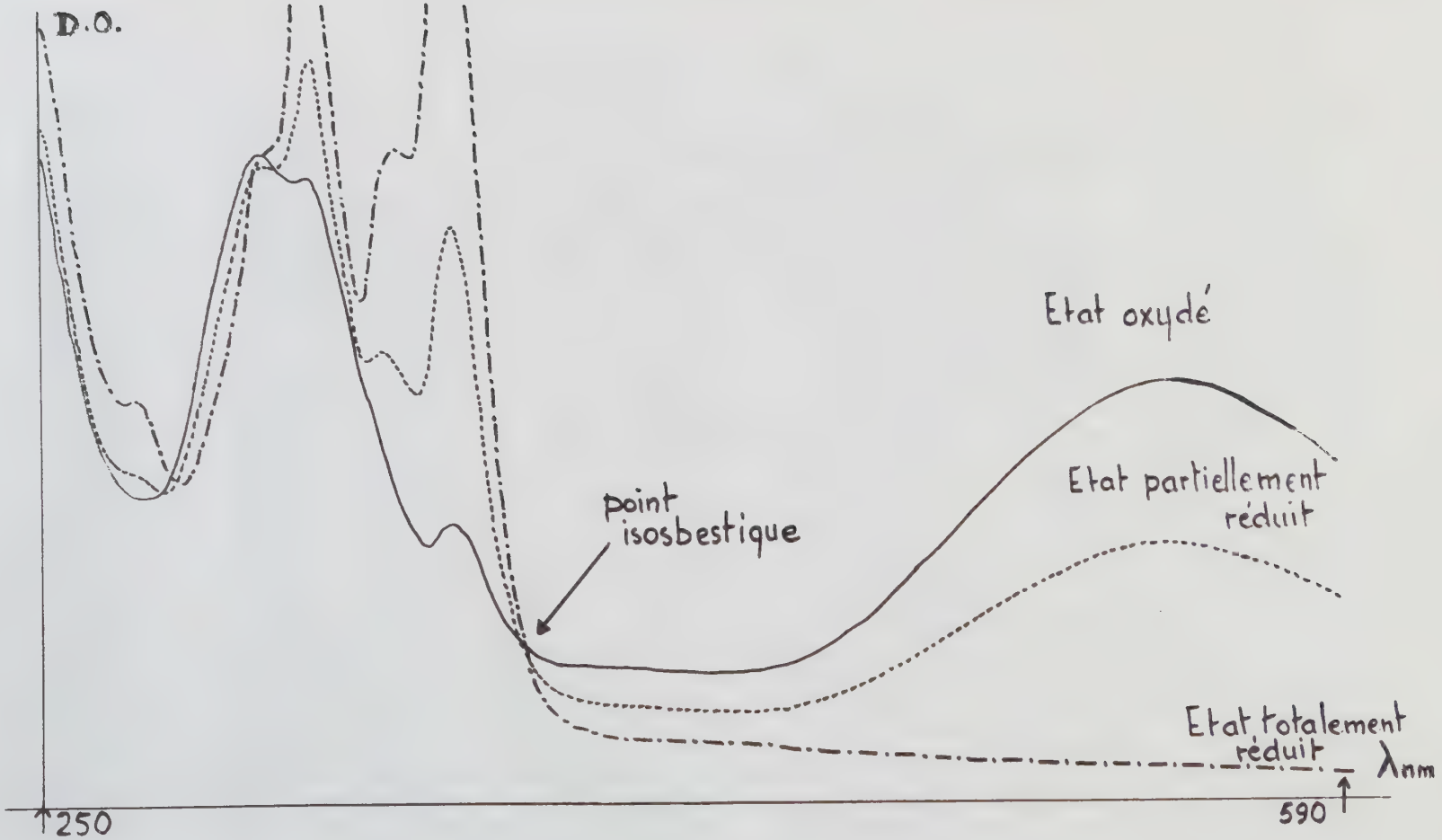


Fig. 16 - Etude des modifications du spectre ultra-violet par réduction progressive du pigment purifié en solution chloroformique.

1. état oxydé
2. état partiellement réduit
3. état totalement réduit

Comment expliquer que la forme oxydée soit favorisée par le chloroforme, et la forme réduite par les autres solvants ? Nous ne pouvons actuellement répondre à cette questions.

V - AUTRES PROPRIETES.

L'analyse élémentaire du pigment purifié a donné les résultats suivants (deux dosages) :

	C	H	N	O
p. 100	61,57	4,28	Absence ou	32,42
p. 100	61,33	4,41	traces	32,12

L'absence de soufre a été vérifiée par la méthode mentionnée p.84.

Bien que le résidu fixe soit nul ou très faible, nous avons cru bon de rechercher, par polarographie, la présence d'un métal : cette recherche a été négative.

Le pigment purifié n'est pas suffisamment soluble dans les solvants aprotiques pour être étudié en R.M.N. classique (1).

Les spectres I.R. ne conduisent à aucun résultat interprétable.

Les spectres de masse suggèrent l'existence de plusieurs homologues diversement méthylés, mais n'autorisent aucune hypothèse sur la structure du squelette de la molécule.

(1) Peut-être la R.M.N. par accumulation pourra-t-elle apporter des informations utiles, ainsi que celle du carbone 13.

VI - CONCLUSIONS DE CES ETUDES.

L'absence d'azote, l'absence de métal (excluant l'éventualité d'un complexe organo-métallique), les caractères de solubilité, les caractéristiques spectrales, aucun de ces résultats ne nous a [redacted] permis, à ce stade de nos recherches, de rattacher de manière évidente le pigment de *Corticium caeruleum* à un groupe connu de pigments naturels bleus ou violets ; sa richesse relative en oxygène, ses propriétés oxydo-réductrices spectaculaires et l'absence d'azote incitent à le considérer comme une quinone, vraisemblablement polymérisée.

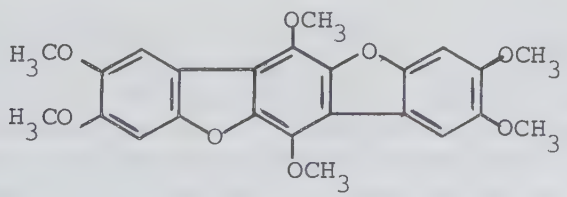
C'est alors que nous avons eu connaissance de la découverte récente, dans une souche de *Corticium caeruleum* de l'éther hexaméthylique de l'acide leucothéléphorique.

CHAPITRE III

PARENTÉ DU PIGMENT DE *CORTICIUM CAERULEUM* AVEC L'ACIDE THÉLÉPHORIQUE

I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

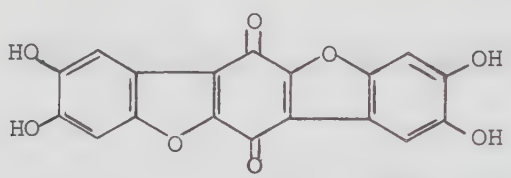
En 1972 a paru dans la revue *Phytochemistry* un article qui, à notre connaissance est la première publication se rapportant à la chimie de *Corticium caeruleum (1)*; WEISGRABER, WEISS, MILNE et SILVERTON y relatent l'isolement à partir de l'extrait hexanique du mycélium, d'une quantité minime d'un composé cristallisé *incolore*, qu'ils ont identifié à l'éther hexaméthylique de l'acide leucothéléphorique :



(1) En dehors des travaux de BOIDIN mentionnant la présence d'enzymes chez cette même espèce.

Ces auteurs ne précisent pas dans quel but ils ont analysé le mycélium de *C.caeruleum* (on peut penser que leur extrait hexanique résulte d'une opération de délipidation) et, remarque particulièrement importante, *ils ne font pas la moindre allusion à la parenté du composé trouvé par eux avec le pigment bleu-violet du Champignon*. En revanche, ils précisent que c'est la première fois qu'un dérivé théléphorique est rencontré dans la famille des Corticiacées, et développent sur ce thème quelques considérations chimiotaxonomiques.

L'"acide" théléphorique lui-même est un composé dibenzofurannique, à la fois phénolique et quinonique, dont la formule a connu diverses vicissitudes ; sa structure exacte a été déterminée en 1960 par GRIPENBERG et confirmée ultérieurement pas synthèse ; une revue complète de ces travaux est donnée par THOMSON (1971).



Ce composé se rencontre chez divers Basidiomycètes de l'ordre des Aphyllophorales : *Thelephora* (d'où il tire son nom), *Hydnum*, *Hydnellum*, *Polystictis*, *Phlebia*, et d'autres. On l'a signalé également chez les lichens. Rappelons que les *Thelephora* sont voisins des *Corticium*.

Des dérivés d'acétylation ou de méthylation de l'acide *leuco*-théléphorique (1), parmi lesquels l'éther hexaméthylique mentionné plus haut, ont été obtenus par voie chimique, notamment par GRIPENBERG ; c'est d'ailleurs par comparaison avec l'und'eux que WEISGRABER et coll. ont identifié le composé isolé par eux du mycélium de *Corticium caeruleum*.

(1) c'est-à-dire ayant perdu par réduction la structure quinonique du noyau central.

Si les dérivés acétylés ou méthylés mentionnés dans la littérature sont incolores, en revanche, l'acide théléphorique lui-même est un pigment qui se présente sous l'aspect de cristaux violet foncé, presque noirs ; on est donc tenté de faire un rapprochement avec la pigmentation de *C. caeruleum* rapprochement qui, répétons-le, semble avoir échappé à WEISGRABER et coll. (dont les préoccupations sont peut-être orientées dans une autre direction).

Pour notre part, nous avons immédiatement dirigé nos recherches dans cette nouvelle voie.

II - RECHERCHE DE L'ETHER HEXAMETHYLIQUE DE L'ACIDE LEUCOTHELEPHORIQUE

Dès la lecture de l'article de WEISGRABER **et coll.**, nous avons été frappée par la coïncidence entre les maxima d'absorption dans l'U.V. de leur éther hexaméthylique et ceux que présente notre "pigment purifié" sous sa forme réduite. En nous reportant à une publication de GRIPENBERG (1960) qui donne les ε correspondants, nous avons pu tracer le spectre de ce dérivé. La ressemblance entre les deux spectres est évidente (1) (fig. 17 et 14) et suggère donc la présence, dans le pigment purifié, d'un ou de plusieurs composés possédant le squelette de l'acide théléphorique sous sa forme réduite ; l'acide théléphorique lui-même, sous forme quinonique, possède un spectre d'absorption différent.

La première des investigations à mener était de vérifier si notre souche produisait l'éther hexaméthylique trouvé par WEISGRABER et coll. A cette fin nous avons pratiqué des extractions par l'hexane, au **Soxhlet**, pendant vingt heures, sur :

- des mycéliums bleus, au nombre de vingt-huit âgés de dix-huit jours
- du pigment purifié

(1) On notera toutefois qu'il y a des différences quantitatives sur la hauteur des pics (Cf. Fig.17 p.suivante).

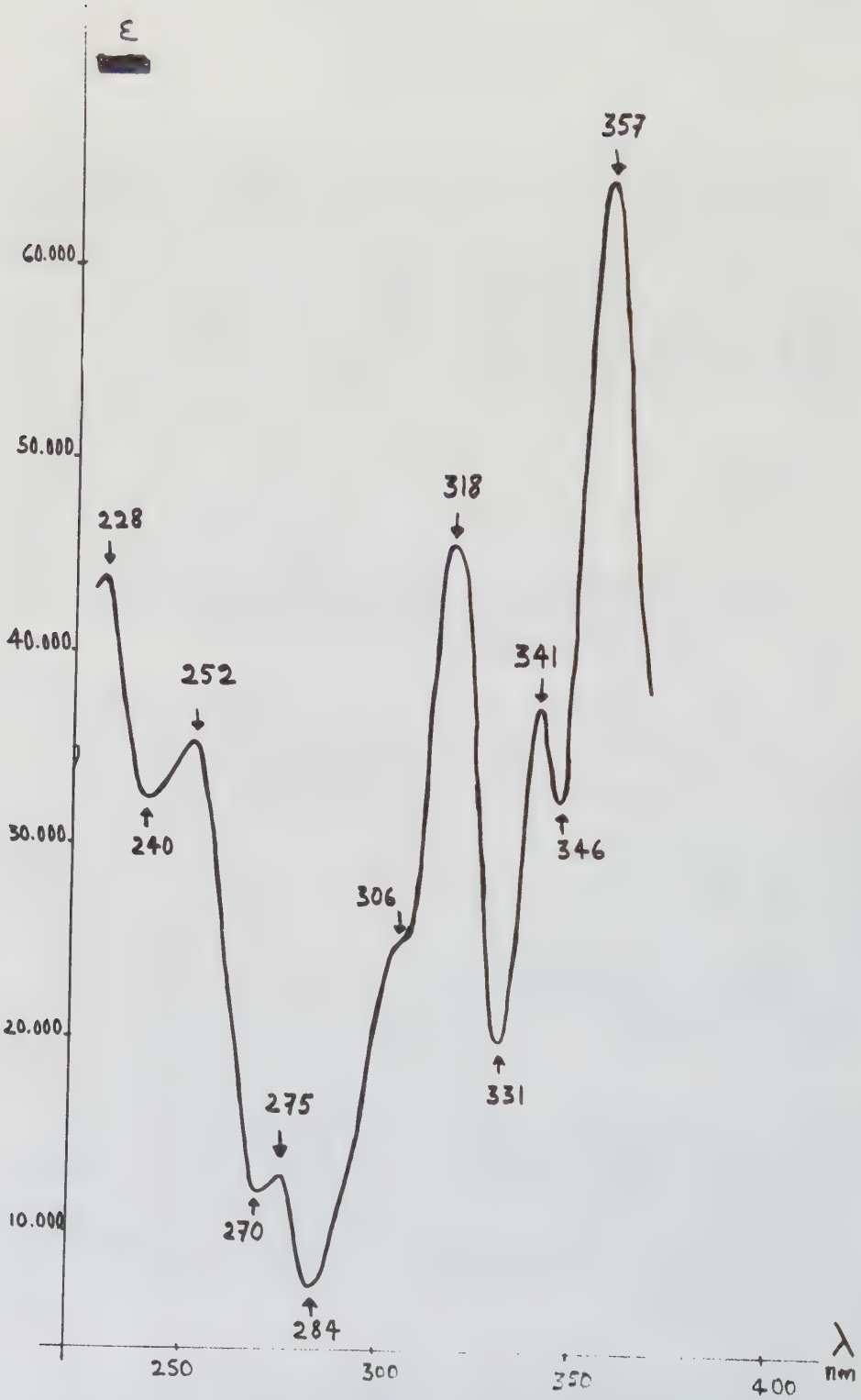


Fig. 17 - Spectre ultra-violet construit du dérivé hexaméthylique de l'acide leucothélephorique (d'après WEISGRABER et coll.).

- des mycéliums blancs, au nombre de huit, âgés de dix-neuf jours, obtenus par culture à l'obscurité.

Les résultats sont les suivants :

a) les mycéliums bleus, ainsi que la poudre pigmentaire fournissent des extraits hexaniques incolores qui présentent le même spectre que le pigment lui-même, ce qui est en faveur de la présence du squelette leuco-théléphorique dans ces extraits. En revanche, il ne nous a pas été possible d'obtenir, par évaporation de ces extraits, des cristaux de l'éther hexaméthylique, dont la cristallisation ne semble pas cependant poser de problèmes ; en outre, le résidu sec amorphe, incolore ou faiblement jaunâtre, repris par le chloroforme, se colore en bleu en quelques secondes par simple agitation au contact de l'air.

Il semble donc que le ou les composés théléphoriques présents dans l'extrait hexanique aient conservé la structure diphénolique du noyau central, susceptible d'être oxydé en quinone, ce qui est peu compatible avec la présence de l'hexaméthyléther (lequel pourrait toutefois coexister en faibles proportions avec les autres composés de l'extrait).

b) quant aux mycéliums blancs, ils ne paraissent céder à l'hexane aucun dérivé théléphorique, si l'on en juge par leur spectre d'absorption, très différent de ceux mentionnés plus haut. Ce spectre présente au contraire les caractéristiques de celui de l'ergostérol ; l'évaporation de l'extrait conduit à un composé cristallisé incolore, qui donne la réaction de SALKOWSKI et celle de LIEBERMANN.

La présence d'ergostérol n'a rien d'exceptionnel.

Par la même occasion nous avons constaté que ces mycéliums blancs ne produisent pas le composé phénolique cité page 83.

En conclusion, on peut dire que :

1°) notre souche de *Corticium caeruleum* ne semble pas synthétiser l'éther hexaméthylique de l'acide leucothéléphorique, tout au moins en quantité suffisante pour être obtenu à l'état cristallisé.

2°) au contraire, les mycéliums bleus, ou le pigment qui en est extrait, renferment un ou plusieurs composés à squelette théléphorique donnant lieu à l'équilibre rédox (forme bleue $\rightleftharpoons$ leucodérivé) donc vraisemblablement non substitués sur le noyau central.

3°) la biosynthèse de ces composés est sous la dépendance de la lumière, ce qui corrobore les observations physiologiques de la première partie de notre travail. A noter qu'il en va de même pour le composé phénolique (1) dont la biosynthèse serait ainsi liée à celle du pigment, ou tout au moins concomitante ; à l'obscurité au contraire, l'anabolisme serait orienté plutôt vers la synthèse de l'ergostérol, puisque celui-ci n'a pas été décelé dans les extraits de mycéliums bleus ni dans le pigment.

III - ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

A ce stade de nos recherches, il importait de préciser la nature des dérivés théléphoriques dont le spectre U.V. suggère la présence dans le pigment. Nous avons fait appel à la spectrométrie de masse qui présente l'avantage de donner des indications utiles, même lorsque le produit n'offre pas toutes les garanties de pureté souhaitables ; cette étude a porté d'une part sur le pigment lui-même, d'autre part sur le produit de son acétylation.

A - *RESULTATS CONCERNANT LE PIGMENT LUI-MEME.*

Les spectres de masse (2) effectués sur différents échantillons de pigment purifié ne sont pas toujours

(1) si les mycéliums présentent la moindre "trace" de bleu, la recherche du phénol est positive.

(2) Deux spectromètres de masse ont été utilisés :
- *pour la basse résolution un AEI MS 12, pouvoir de résolution de l'ordre de 2000.*
- *pour la haute résolution un AEI MS 9, pouvoir de résolution de l'ordre de 12000.*

L'échantillon est placé dans une sonde à introduction directe et à température contrôlée.

absolument identiques, tant par la nature des pics observés que par leur importance relative ; on peut toutefois en tirer des indications intéressantes, surtout si l'on effectue la haute résolution des pics les plus significatifs.

La substance qui parvient à l'état gazeux dans la source de l'appareil (c'est à dessein que nous utilisons cette périphrase ...) apparaît alors comme un *mélange* responsable de différents pics moléculaires, les autres étant des pics de fragmentation.

Parmi les premiers, les plus importants s'observent à m/e = 396 et m/e = 410, le second étant généralement moins intense. Le pic de m/e = 366 présente lui aussi une intensité relativement importante.

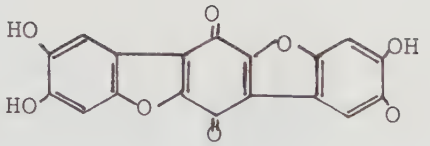
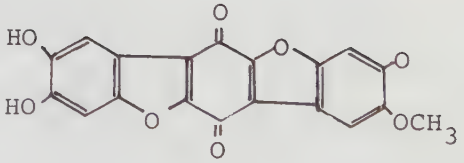
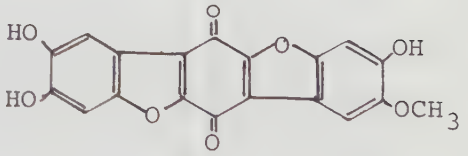
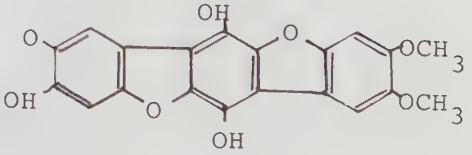
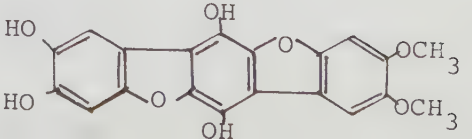
Plusieurs pics suggèrent une filiation entre homologues différant par un ou plusieurs CH_2 (m/e = 14) ou par un ou plusieurs groupes acétyle (m/e = 42 = 14x3). La haute résolution permet de lever l'ambiguïté, lorsqu'elle existe.

Le tableau suivant rassemble la liste des principaux pics observés, les formules brutes obtenues par haute résolution et les formules développées que l'on peut proposer sur la base de l'hypothèse qu'il s'agit de dérivés de l'acide théléphorique. On voit que l'on obtient un système cohérent, mais il nous faut bien insister sur le caractère hypothétique, quoique vraisemblable, de ces formules ; en particulier, la position des substituants sur les noyaux extrêmes n'est indiquée que par analogie avec les dérivés théléphoriques connus, mais il n'est pas interdit d'envisager d'autres isomères.

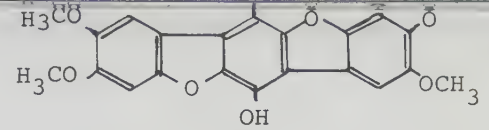
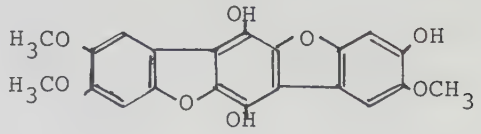
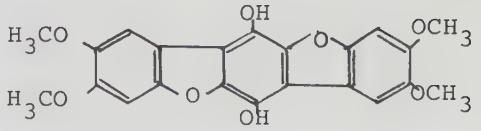
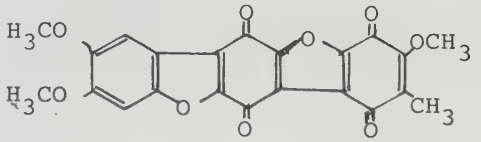
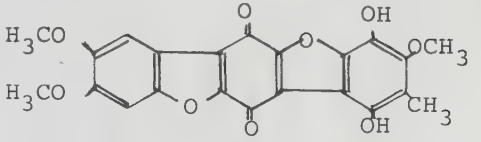
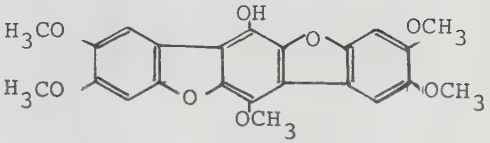
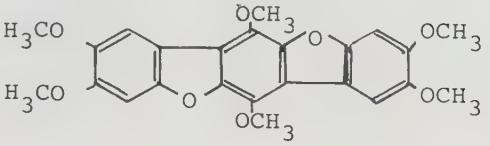
La couleur du pigment serait due aux constituants possédant la structure quinonique ; au contraire, les dérivés de l'acide leuco-théléphorique n'interviendraient pas à ce point de vue.

Le pic m/e = 352 pouvait , *a priori*, être considéré comme celui de l'acide théléphorique lui même ($C_{18}H_8O_8$ = 352) . Mais la haute résolution suggère qu'il s'agit plutôt du dérivé 351 comportant un atome de ^{13}C.

Cette conclusion repose sur la valeur de l'erreur relative qui existe, pour chaque hypothèse, entre la masse

351	$C_{18}H_7O_8$	< 1 p.p.m.	*Pic de fragmentation* (reste d'acide théléphorique) provenant sans doute de l'éther monométhylique par perte d'un CH_3. F *Forme quinonique colorée.*	
352	$^{13}C^{12}C_{17}H_7O_8$	<1 p.p.m.	*Pic moléculaire peu intense* correspondant vraisemblablement au composé 351 comportant un atome de ^{13}C.	
365	$C_{19}H_9O_8$	< 5 p.p.m.	*Pic de fragmentation* dérivant soit du 366, soit d'un composé plus lourd.	
366	$C_{19}H_{10}O_8$	< 4 p.p.m.	*Pic moléculaire.* Ether monométhylique de l'acide théléphorique, sous forme quinonique colorée.	
381	$C_{20}H_{13}O_8$	< 5 p.p.m.	*Pic de fragmentation* dérivant soit du 382, soit d'un composé plus lourd.	
382	$C_{20}H_{14}O_8$	< 5 p.p.m.	*Pic moléculaire.* Ether diméthylique de l'acide leucothéléphorique. (forme phénolique incolore)	

395	$C_{21}H_{15}O_8$	<5 p.p.m.	*Pic de fragmentation* dérivant soit du 396, soit d'un composé plus lourd.
396	$C_{21}H_{16}O_8$	<4 p.p.m.	*Pic moléculaire.* Ether triméthylique de l'acide leucothéléphorique. (forme phénolique incolore)
410	$C_{22}H_{18}O_8$	<5p.p.m.	*Pic moléculaire.* Ether tétraméthylique de l'acide leucothéléphorique. (forme phénolique incolore)
422	$C_{22}H_{14}O_9$	<5p.p.m.	*Pic moléculaire très peu intense.* Plusieurs possibilités, probablement toutes quinoniques.
424 (doublet)	$C_{22}H_{16}O_9$	< 6 p.p.m.	*Pic moléculaire très peu intense.* correspondant sans doute au 422 dihydrogéné (encore quinonique)
	$C_{23}H_{20}O_8$	< 8 p.p.m.	*Pic moléculaire.* Ether pentaméthylique de l'acide leucothéléphorique. (forme phénolique incolore)
438	$C_{24}H_{22}O_8$	< 4 p.p.m.	*Pic moléculaire.* Ether hexaméthylique de l'acide leucothéléphorique. (forme phénolique incolore) Pic peu intense

moléculaire donnée par l'appareil (valeur trouvée) et la masse moléculaire calculée à partir de la formule brute supposée. On a ainsi :

a) $C_{18} H_8 O_8$ (m/e = 352)

valeur calculée :	352,02190
valeur trouvée :	352,01660
différence	0,00530

soit une erreur relative de 15 p.p.m., ce qui est nettement excessif (1).

b) $^{13}C\ ^{12}C_{17} H_7 O_8$ Dans ce cas 352 correspond à ^{13}C de 351

On peut calculer la masse correspondante :

$^{12}C_{18} H_7 O_8$ = 351,01308

$^{13}C - ^{12}C$ = 1,00335

d'où $^{13}C\ ^{12}C_{17} H_7 O_8$ = 351,01309 + 1,00335 = 352,01643

Dans ce cas, on a :

valeur trouvée :	352,01660
valeur calculée :	352,01643
différence	0,00017

soit une erreur relative inférieure à 0,5 p.p.m., ce qui est tout à fait compatible avec l'hypothèse basée sur la présence d'un atome de ^{13}C.

Toutefois, il n'est pas exclu que l'acide thélé-phorique soit présent, mais en très faibles quantités.

(1) La valeur de 10 p.p.m. représente le maximum admissible pour l'erreur relative.

B - RESULTATS CONCERNANT LE DERIVE D'ACETYLATION DU PIGMENT.

Le pigment purifié a été acétylé par la technique suivante :

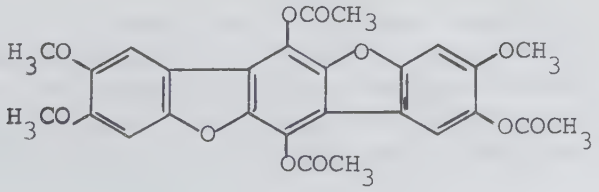
Le pigment (0,10 g) est dissous dans un excès de pyridine non rectifiée (donc comportant des impuretés réductrices) et laissé à son contact une nuit, de manière à laisser s'opérer la réduction de la forme quinonique.

Le lendemain on ajoute 2 ml d'anhydride acétique et on chauffe à l'ébullition à reflux pendant trente minutes. On ajoute ensuite un large excès d'eau distillée glacée qui hydrolyse l'excès d'anhydride acétique et précipite le produit d'acétylation du pigment.
Celui-ci est recueilli par filtration sur verre fritté n° 3, lavé abondamment à l'eau, séché sous vide en présence de $P_2 O_5$, puis dissous dans le chloroforme dans lequel il se montre très soluble.

Les essais de cristallisation, tant à partir du chloroforme que d'autres solvants, ont échoué, ce qui tendrait à confirmer l'hypothèse du polymère. On obtient une sorte de laque sèche, brun foncé, que l'on peut pulvériser, mais qui apparait amorphe.

En revanche, en traitant cette poudre par l'hexane à chaud on peut en extraire une très faible quantité d'un composé qui cristallise à partir de ce solvant sous forme d'aiguilles incolores.

Le spectre de masse donne pour ce composé une masse moléculaire de 522 ; on observe les pics correspondant à l'élimination de une, deux et trois molécules de cétène. Ces faits sont compatibles avec la formule du triacétate de l'éther triméthylique de l'acide leucothéléphorique :



Après trois épuisements par l'hexane bouillant, la poudre brun foncé résiduelle (qui représente la quasi-totalité de la substance mise en expérience) a été elle aussi étudiée par spectrométrie de masse. On retrouve la même série de pics que ci-dessus, ce qui pourrait suggérer que l'épuisement n'a pas été suffisant, mais cette explication doit être rejetée pour au moins deux raisons.

D'une part, la substance extractible par l'hexane est très peu abondante, comme il a déjà été indiqué, et l'on n'observe pas sur les spectres de masse des pics autres que ceux explicables par la formule ci-dessus. D'autre part, les spectres de la poudre brune ont été obtenus même lorsque la température de la sonde est élevée (270° C et plus) à ces températures le composé de masse 522 est volatilisé depuis longtemps.

La seule explication plausible nous paraît être, ici encore celle qui invoque l'existence d'un polymère dont les motifs élémentaires auraient le squelette de l'acide théléphorique et seraient plus ou moins acétylables selon le nombre d'hydroxyles phénoliques libres, avec prédominance du dérivé trihydroxylé, (c'est-à-dire celui de masse 396) ce qui est en accord avec les spectres de masse du pigment lui-même.

L'acétylation respecterait la structure polymérisée (ou ne la détruirait que très peu, ceci expliquant l'apparition d'une faible quantité du composé de masse 522, à moins qu'il ne dérive d'un peu de composé 396 libre...) ; en revanche, le polymère acétylé subirait -comme le pigment lui-même- une dégradation thermique dans la sonde de l'appareil, conduisant au spectre de masse observé.

IV - DISCUSSION

Cette théorie du pigment-polymère nous paraît intéressante à plusieurs points de vue. Outre qu'elle permet d'interpréter les spectres de masse du pigment lui-même et de son produit d'acétylation, elle "expliquerait" un certain nombre de faits que nous avons rencontrés tout au long de ce travail, et que nous avons signalés au fil des pages :

- la "croûte" pigmentaire bleue, qui paraît incrustée dans la paroi des hyphes, n'est jamais complètement extractible par le chloroforme ; on peut penser qu'au-delà d'un certain degré de polymérisation, le pigment devient insoluble.
- le résidu d'évaporation d'une solution chloroformique de pigment ne se redissout jamais complètement dans ce solvant.
- les chromatographies sur couche mince du pigment donnent lieu fréquemment à des traînées semblables à celles qu'on observe avec d'autres polymères végétaux (les tannins par exemple).

Malheureusement, un essai de détermination de la masse moléculaire par cryométrie dans le camphre n'a conduit à aucun résultat interprétable, en raison de la décomposition du produit.

Néanmoins, les autres arguments nous paraissent suffisants pour considérer comme plausible l'état polymérisé du pigment ; en revanche, nous n'avons aucun renseignement sur le mode de polymérisation.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nos recherches sur une souche de l'Aphyllophorale lignicole *Corticium caeruleum* avaient pour thème certains aspects de sa pigmentogenèse en culture et l'ébauche de l'étude chimique de son pigment. Ce travail comporte donc deux parties : une partie physiologique et une partie chimique.

*

Après la présentation des techniques générales choisies pour la culture de ce Champignon, la première partie expose nos observations sur le rôle de la lumière dans la biosynthèse du pigment bleu. Nous montrons que la lumière est indispensable à celle-ci, nous définissons les conditions optimales d'éclairement et, par l'emploi adéquat de filtres relativement sélectifs, nous prouvons que les radiations les plus efficaces sont celles dont la longueur d'onde est inférieure à 500 nm.

Ces résultats ayant montré qu'il était possible de dissocier la croissance de la pigmentogenèse en jouant sur le facteur lumière, nous avons voulu savoir si une telle dissociation pouvait être réalisée à la lumière, en agissant cette fois sur les facteurs de nutrition.

Quelques tentatives avec des milieux naturels n'ayant pas abouti à l'effet recherché (soit par insuffisance de croissance, soit par pigmentation plus ou moins

accentuée) nous nous sommes orientée vers la recherche d'un milieu synthétique, ce type de milieu étant d'ailleurs utilisé classiquement dans les études de nutrition.

Un milieu dérivé de celui de Czapek, renfermant du glucose comme source de carbone et d'énergie, et du citrate d'ammonium comme source d'azote, a permis, en l'absence de facteurs vitaminiques, d'observer une croissance suffisante sans pigmentation. Il a donc été choisi comme milieu de base.

L'effet favorable de l'extrait de levure sur la pigmentation, tel qu'il apparaît dans le milieu G.E.L., nous a incitée à étudier le rôle des acides aminés et celui des vitamines.

En présence d'un mélange de vitamines, les aminoacides, étudiés individuellement, donnent des résultats très inégaux ; trois d'entre eux seulement (glycocolle, L-sérine et L-asparagine) permettent la pigmentation.

Parmi les vitamines, la thiamine joue un rôle prépondérant puisque à elle seule elle permet une croissance et une pigmentation satisfaisantes. La concentration optimale se situe vers 0,04 mg/l, ce qui est l'ordre de grandeur classiquement indiqué par les auteurs. A partir de 0,4 mg/l un effet inhibiteur semble apparaître.

Enfin nous avons pu montrer qu'à l'instar de beaucoup de Champignons, *C.caeruleum* est capable de synthétiser la partie thiazolique de la molécule de thiamine, mais est dépendant de la fraction pyrimidique.

En conclusion, il semble que la thiamine représente le facteur essentiel de la pigmentogenèse à la lumière. On comprend mieux ainsi le rôle de l'extrait de levure qui, toutefois, doit être plus complexe puisqu'il conduit à des résultats supérieurs.

*

L'étude chimique du pigment s'est révélée très délicate, en raison de son instabilité, mais nous a permis néanmoins de réunir un ensemble de résultats intéressants.

Après avoir confirmé en microscopies photonique et électronique la localisation pariétale du pigment, nous avons expérimenté diverses méthodes d'extraction et étudié les facteurs de l'instabilité du pigment (influence de la lumière, de l'oxydo-réduction, du pH) ; ces essais nous ont menée à une technique d'extraction par le chloroforme, qui conduit à un "pigment brut". Au cours de la purification de celui-ci nous avons isolé un composé phénolique cristallisé dépourvu d'azote et de soufre, dont l'étude a été entreprise par un autre chercheur de notre équipe.

Le pigment purifié issu des opérations précédentes nous a révélé plusieurs de ses caractéristiques : solubilité, comportement chromatographique, propriétés spectrales dans le visible et dans l'ultra-violet, propriétés oxydo-réductrices ; en particulier, nous avons pu estimer la valeur de son potentiel d'oxydo-réduction, et montrer, par spectroscopie d'absorption, les relations existant entre la forme réduite et la forme oxydée. L'analyse élémentaire montre que le pigment renferme exclusivement du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène ; cette propriété, jointe à d'autres, nous incite à le situer parmi les quinones.

La découverte récente, aux Etats-Unis, de l'éther hexaméthylique de l'acide leucothéléphorique dans une souche de *Corticium caeruleum*, et la ressemblance de son spectre d'absorption U.V. avec celui de notre pigment, nous ont suggéré la parenté possible de ce dernier avec cette famille de dérivés dibenzofuranniques. Etant donné l'absence de critères rigoureux de pureté de notre pigment, qui n'a jamais pu être cristallisé, la spectrométrie de masse nous a paru être la seule méthode capable d'apporter des informations interprétables.

Effectivement, les spectres de masse révèlent une série de pics qui, par haute résolution, conduisent à des formules brutes compatibles avec une série de dérivés théléphoriques dont nous donnons la liste ; ceux d'entre eux qui sont sous forme quinonique seraient responsables de la couleur bleue du pigment. L'acide théléphorique lui-même ne semble pas être présent à l'état libre, ou seulement

à l'état de traces. Quant à son éther hexaméthylique, signalé par les auteurs américains, nous n'avons pu l'obtenir à partir de notre souche, qui doit n'en produire que très peu.

Il est très vraisemblable que toutes les molécules dont les spectres de masse révèlent l'existence sont plus ou moins polymérisées ; divers arguments plaident en faveur de cette théorie, mais nous n'avons aucun renseignement sur le mode de liaison des monomères.

La spectrométrie de masse du dérivé acétylé du pigment confirme les résultats obtenus avec le pigment lui-même.

Il est évident que de nombreux problèmes restent posés par le pigment de *Corticium caeruleum*, mais nous espérons que notre travail contribuera à en faciliter l'éclaircissement.

B I B L I O G R A P H I E

AINSWORTH (G.C.) and BISBY (G.R.) (1961).- Dictionnary of the Fungi.
5ème Ed. Butler and Tanner. Ed. Frome and London.

AINSWORTH (G.C.) et SUSSMAN (A.S.) (1965).- The Fungi.
Academic Press. New-York, London.

BABU SINGH YADAV (1963).- Effect of ultraviolet and visible radiation on the sporulation of species of *Helminthosporium*.
Dissert. Abstr. U.S.A., 24, n° 5, 1786-7.

BAUTE (R.) (1964).- Recherches sur la biologie et la pigmentogenèse *d'Epicoccum nigrum*. Link (Adélomycètes).
Editions pyrénéennes Bagnères-de-Bigorre.

BEAUMONT (P.C.), EDWARDS (R.L.) et ELSWORTHY (G.C.) (1968).- Constituents of the Higher Fungi. Part VIII. The Blueing of *Boletus* species. Variegatic acid, a hydroxytetronic acid from *Boletus* species and a reassessment of the structure of boletol.
J. Chem. Soc. (C), 2968-74.

BERTRAND (G.) (1901).- Compt. rend., 133, 1233.

BERTRAND (G.) (1902).- Compt. rend., 134, 124.

BESSEY (E.A.) (1904).- Über die Bedigungen der Farbbildung bei *Fusarium*.
Flora, 93, 301-334.

BESSEY (E.A.) (1965).- Morphology and taxonomy of Fungi. Hafner Publisching Company. New-York-London.

BINDL (E.), LANG (W.) et RAU (W.) (1970).- Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese.VI. Zeitlicher Vertauf der Synthese der einzelnen Carotinoide bei *Fusarium aquaeductum* unter verschiedenen Induckions bedingungen. *Planta, Allem.*, 94, n° 2, 156-74.

BJORNSSON (I.P.) (1959).- Responses of certain fungi, particularly *Trichoderma* sp., to light. Washington Acad. Sci., 49, n° 9, 317-23.

BOIDIN (J.) (1968).- Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés. *Rev. Mycol. Fr.*, (mem. hors série) n° 6.

BOURDOT (H.) et GALZIN (A.) (1927).- Contribution à la flore mycologique de France. Hyménomycètes de France. Hétérobasidiés, Homobasidiés, Gymnocarpes. Marcel Bry Ed.

BRANDT (W.H.) (1964).- Morphogenesis in *Verticillium* : effects of light and ultraviolet radiation on microsclerotia and melanin. *Canad. J. Bot.*, 42, n° 8, 1017-23.

BU'LOCK (J.D.) et SMITH (J.R.) (1968).- Modified anthraquinones from *Penicillium islandicum*. *J. Chem. Soc.*, C, G.B., n° 16, 1941-4.

CARBONE (L.J.) et JOHNSON (G.T.) (1964).- Growth and pigmentation of *Aspergillus umbrosus*. Mycologia, E.U., 56, n° 2, 185-95.

CARLEY (H.E.), WATSON (R.D.) et HUBER (D.M.) (1967).- Inhibition of pigmentation in *Aspergillus niger* by dimethylsulfoxide. *Canad. J. Bot.*, 45, n° 8, 1451-3.

CHARLES (J.H.V.), RAISTRICK (H.), ROBINSON (R.) et TODD (A.R.) *(1933) Biochem. J.*, 27, 499.

CHOLLET (M.M.) (1964).- Formation des pigments chez l'*Aspergillus mangini* et leur transformation au cours du cycle végétatif. Influence de divers facteurs. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 17, n°1, 9-28.

COCHRANE (V.W.) (1958).- Physiology of Fungi.
Wiley and Sons Ed., New-York.

ERDTMAN (H.) (1948).- Corticrocin a pigment from the mycelium of a Mycorrhiza Fungus. II.
Acta Chem.Scand., 2, 209-21.

FRIES (N.) (1948).- The nutrition of fungi from the aspect of growth factor requirements.
Trans. Brit. Mycol. Soc., 30, 118-34.

FUJISE (J.), HISHIDA (S.), SHIBATA (M.) et MATSUEDA (S.) (1961).- Structure of fusaroskyrin, a pigment of *Fusarium species* : a pathogen of the soybean purple speck disease.
Chem. and Insdustry, G.B., n° 43, 1754-5.

GABRIEL (Mme M.) (1960).- Recherches sur les pigments des Agaricales III. Pigments des Cortinaires des groupes *Cinnamomei et Sanguinei*.
Bull. trim. Soc. Mycol. Fr., 76, n° 2, 208-15.

GALMARINI (O.L.) et STODOLA (F.H.) (1965).- Foncecin a pigment from an *Aspergillus fonsecaeus* mutant.
J. Org. Chem., U.S.A., 30, n° 1, 112-5.

GLUCHOFF (K.) et LEBRETON (P.) (1970).- Recherches chimiotaxonomiques sur les Champignons. Premiers résultats sur les propriétés et la structure du pigment majeur rouge des Russules (Basidiomycètes).
C.R. Ac. Sci. D. Fr., 270, n° 1, 213-6.

GONDO (M.), ARIMURA (M.) et KIHARA (H.) (1969).- Effects of various factors on sclerotial formation of *Corticium rolfsii*. *Kagoshima Daigaku Nogakuku gakujutsu Hokuku*, n° 19, 51-66.

GOODWIN (T.W.) (1965).- Chemistry and Biochemistry of plant pigments.
Academic Press. London and New-York.

GOULD (B.S.) et RAISTRICK (H.) (1934).-
Biochem. J., 28, 1640.

GRIPENBERG (J.) (1952).- Fungus Pigments.II.-Cortisalin, a new polyethenoid Pigment.
Acta Chem. Scand., 6, 580-86.

GRIPENBERG (J.) (1960).- Fungus pigments. XII.-The structure and Synthesis of Thelephoric acid.
Tetrahedron, 10, 135-43.

GRIPENBERG (J.) (1970).- Fungus Pigments. XXI.-Peniophorinin, a further pigment produced by *Peniophora sanguinea*. Bres. *Acta Chem. Scand.*, 24, n° 10, 3349-3454.

GRIPENBERG (J.) et MARTIKKALA (J.) (1970).- Fungus Pigments. XX.-On the structure of peniophorin, one of the pigments produced by *Peniophora sanguinea* Bres. *Acta. Chem. Scand., Danem.*, 24, n° 10, 3444-8.

HAMASAKI (T.), HATSUDA (Y.), TERASHIMA (N.) et REMBUTSU (M.) (1965) .- The structure of two new metabolites of *Aspergillus versicolor*.
Agric. biol. Chem. Jap., 29, n° 2, 166-7.

HAMASAKI (T.), RENBUTSU (M.) et HATSUDA (Y.) (1967).- A red pigment from *Aspergillus versicolor*. (Vuillemin) Tiraboshi.
Agric. Biol. Chem., Jap., 31, n° 12, 1513-4.

HAWKER (L.E.) (1950).- Physiology of Fungi.
University of London Press. London.

HEIM (R.), (1057).- Les Champignons d'Europe.
Boubée Ed.

ITO (Y.), FUJII (T.), NOZAWA (Y.) et TAKEYAMA (A.) (1965).- Thin-layer chromatography of the pigments isolated from some *Trichophyton species*.
J. Invest. Dermatol., U.S.A., 44, n° 5, 345-7.

JOHNSON (G.T.) et GOULD (B.S.) (1953).- Pigment production in certain of the *Aspergillus glaucus* group.
Mycologia, U.S.A., 45, n° 2, 172-193.

KIKUCHI (M.) (1961).- Recherches sur la formation de pigment chez *Penicillium islandicum* Sopp. NRRL 1036 en culture.
Bot. Mag., Jap., 74, n° 871, 42-7 (en japonais).

KÖGL (F.) et ERXLEBEN (H.) (1930).-
Monatshefte, 282-27.

KÖGL (F.) et POSTOWSKY (J.J.) (1925).-
Liebigs Ann., 444, 1.

LEACH (C.M.) (1962).- Sporulation of diverse species of Fungi under near ultraviolet radiations.
Canad. J. Bot., 40, n° 1, 151-61.

LILLY (V.G.) et BARNETT (H.L.) (1951).- Physiology of the Fungi.
Mc GRAW-HILL Ed., New-York.

LODDER (J.) et KREGER-VAN RIJ (N.J.W.) (1952).- The Yeasts a taxonomic study.
North-Holland publishing Company, Amsterdam.

LUTZ (L.) (1948).-
Traité de Cryptogamie. Masson Ed.

MARSHALL (D.) et WHITING (M.C.) (1957).- Researches on polyenes . Part. V.-The synthesis of cortisalin.
J. Chem. Soc., 1, 537.

MAUBLANC (A.) (1959).- Les Champignons de France.
Lechevalier Ed.

MEISSNER (G.) et DELBRUCK (M.) (1968).- Carotenes and retinal in *Phycomyces* mutants.
Plant. Physiol., U.S.A., 43, n° 8, 1279-83.

MILLER (M.W.) (1961).- The Pfizer Handbook of microbial metabolites.
Mc GRAW-HILL Ed. New-York.

MOREAU (F.) (1952).- Les Champignons. Physiologie, morphologie, développement et systématique.
Lechevalier Ed.

MORISHITA (E.), TAKEDA (T.) et SHIBATA (S.) (1968).- Metabolic products of Fungi. XXIX.-The structure of aurofusarin.
Chem. Pharm. Bull., Jap., 16, n° 3, 411-3.

MUNTANJOLA-CVETKOVIC (Mme A.) (1965).- Action de la lumière sur la morphogenèse de diverses espèces d'*Aspergillus*.
Thèse Doct. Univ. Paris, Mention Sci., s.l.n.d. I.4°, 192 p.

ODDOUX (L.) (1957).- Recherches sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure. Morphologie-cytologie- exigences alimentaires.
Thèse doct. état, Fac. Sc. Lyon.

PASTAC (I.A.) (1942).- Les matières colorantes des Champignons.
Revue de Mycologie. Mémoire hors série n° 2.

RAMAUT (J.-L.) (1961).- Croissance d'*Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboshi dans des cultures périodiquement privées de magnésium.
Rev. Ferment. Industr. Aliment., Belg., XVI, n° 1.

RAMAUT (J.-L.)(1965).- Etude chromatographique des pigments élaborés par *Aspergillus versicolor*.
Rev. Ferment. Industr. aliment., Belg., 20, n° 3, 90-2.

RAU (W.), LINDEMANN (J.) et RAU-HUND (A.) (1968).- Untersuchungen über die lichtabängige Carotinoidsynthese III. Die Farbstoffbildung von *Neurospora crassa* in Submerskultur.
Planta. Allem., 80, n° 3, 309-16.

ROBERTS (J.C.) et ROFFEY (P.) (1965).- Studies in mycological chemistry. XVII. Averythrin, an anthraquinoid pigment from. *Aspergillus versicolor* (Vuillemain) Tiraboshi.
J. Chem. Soc., G.B., 3666-72.

ROBBINS (W.J.) et KAVANAGH (V.) (1942).- Vitamin deficiencies of the filamentous Fungi.
Bot. rev., VIII, 411-71.

ROBINSON (W.) (1926).- The condition of growth and development of *Pyronema confluens* Tul.
Annals Bot., 40, 245-72.

ROGERS (D.P.) (1943).- The genus *Pellicularia* (Thelephoraceae).
Farlowia, 1 (I), 95-118.

RUSSEL (P.) (1956).- A selective medium for the isolation of. Basidiomycetes.
Nature, 177, 1038-9.

SANNIE (C.) (1946).- Pigments et substances antibiotiques des Champignons et des Bactéries.
Exposés annuels de Biochimie Médicale, 6ème série, Masson Ed.

SHAW (B.L.) et WHITING (M.C.) (1954).-
J.Chem. Soc., 3217.

SHIBATA (S.) et NATORI (S.) (1953).-
Pharm. Bull., 1 , 160.

SHIBATA (S.), NATORI (S.) et UDAGAWA (S.I.) (1964).- List of Fungal Products.
University of Tokyo Press.

SHIBATA (S.), OGIHARA (Y.), KOBAYASHI (N.), SEO (S.) et KITAGAWA (I.) (1968).- The revised structure of luteoskyrin, rubroskyrin and rugulosin.
Tetrahedron Letters, G.B., n° 27, 3179-84.

SHIBATA (S.), SANKAWA (U.), TAGUCHI (H.) et YAMASAKI (K.) (1966).- Biosynthesis of erythroskyrin, a coloring matter of *Penicillium islandicum*. Sopp.
Chem. pharm. Bull., Jap. 14, n° 5, 474-8.

SHOW (B.L.) et WHITING (M.C.) (1954).-
J. Chem. Soc., 3217.

SMITH (E.C.) (1936).- The effects of radiation on Fungi.
In DUGGAR (B.M.). Biological effects of radiations.
Mc GRAW-HILL BOOK C°, New-York.

SMITH (E.F.) et SWINGLE (D.B.) (1904).- The dry rot of potatoes due to *Fusarium oxysporum*.
U.S. Dept. Agric. Bur. Plant. Ind. Bull. LV, 184.

SMITH (G.) (1954).- The pigments of the lower Fungi (moulds)
C.R. huitième Congrès international de Botanique
Paris, 83-97.

STEGLICH (W.), FURTNER (W.) et PROX (A.) (1968).- Neue Pulvinsäure-Derivate aus *Xerocomus chrysenteron* (Bull. ex St Amans) Quel. und Untersuchungen zur Frage des Vorkommens von Anthrachinonpigmenten bei Boletaceen.
Z. Naturforschg., 23 b, 1044-50.

STODOLA (F.H.), RAPER (K.B.) et FENNEL (D.I.) (1951).-
Pigments of *Penicillium herquei*.
Nature, 167, 733-4.

THEIMER (R.R.) et RAU (W.) (1970).- Untersuchungen über die lichtabängige Carotinoidsynthese.V. Aufhebung der Lichtinducktion durch Wasserstoffperoxid.
Planta, Allem., 92, n° 2, 129-37.

TIMMER (L.W.), ERWIN (D.C.) et Mc CORMICK (W.H.) (1970).- Glucose inhibition and inheritance of pigment. producing ability in *Phytophtora*. *Mycologia*, E.U., 62, n° 5, 967-77.

THOMSON (R.H.) (1971).- Naturally occuring quinones. Academic Press.

TURNER (W.B.) (1971).- Fungal metabolites. Academic Press. London, New-York.

UENO (Y.) (1967).- Biotin and the biosynthesis of anthraquinoid pigment in *Penicillium islandicum*. Sopp. *J. Bacteriol.*, U.S.A., 94, n° 3, 786.

UENO (Y.), UENO (I.) et MIZUMOTO (K.) (1968).- The mode of binding of luteoskyrin, a hepatotoxic pigment of *Penicillium islandicum* to a desoxyribo nucleic acid. *Jap. J. exper. Med.*, 38, n° 1, 47-64.

WEEDON (B.C.L.) (1954).- *J. Chem. Soc.*, 4168.

WEISGRABER (K.), WEISS (U.), MILNE (G.W.A.), et SILVERTON (J.V.) (1972)-Hexamethyl ether of leuco-thelephoric acid from *Corticium caeruleum*. Phytochemistry, 11, 2585-7.

ZALOKAR (M.) (1954).- Biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 50, 71-80.

ZUSSMAN (R.A.), VICHER (E.E.) et LYON (I.) (1961).- Nutritional and environmental factors affecting pigmentation in *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol, Mycol, appl.*, Pays-Bas, 14, n° 3, 205-14.

EDITIONS BERGERET 71, rue Leyteire 33000 BORDEAUX
Tél. (56) 91.12.59

TABLE DES MATIERES

Pages

AVANT PROPOS 1

HISTORIQUE 3

I- Les pigments fongiques 3

II- Les facteurs de la pigmentogenèse chez les Champignons 5

1) *Les facteurs nutritionnels* 5
2) *L'influence de la lumière* 6

III- Les travaux sur les *Corticium* 9

1°) *Le genre* Corticium *Fries* 9

2°) *Les principales espèces de* Corticium 10

a- propriétés phytopathogènes 10
b- particularités chimiques 11
c- nutrition 12

3°) *L'espèce* Corticium cæruleum *(Schrad ex Fr.) Fr.* 12

TRAVAUX PERSONNELS

PREMIERE PARTIE : RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES 15

CHAPITRE I : Techniques générales de culture 17

Pages

CHAPITRE II : Pigmentogenèse et lumière ... 21

I- Matériel et méthodes ... 21

II- Résultats et discussion ... 23

1) *Nécessité de la lumière pour la pigmentation* ... 23
2) *Influence de l'éclairement* ... 24
3) *Influence de la longueur d'onde* ... 25
4) *Remarques complémentaires* ... 30

III- Conclusions. ... 30

CHAPITRE III : Pigmentogenèse et nutrition ... 33

I- Techniques. ... 33

1) *Milieux de culture* ... 33
2) *Inoculation* ... 35
3) *Incubation* ... 35
4) *Evaluation de la croissance et de la pigmentation* ... 35

II- Comportement du Champignon sur différents milieux naturels ou synthétiques ... 36

1) *Milieux naturels* ... 36
Résultats ... 36

2) *Milieux synthétiques* ... 39
Formule du milieu de Czapek ... 39
Modifications du milieu de Czapek ... 39

a) Utilisation de gélose purifiée ... 39
b) Remplacement du saccharose ... 40
c) Remplacement de l'ion nitrate ... 40
Résultats ... 40
Conclusions ... 41
d) Addition de facteurs de croissance ... 42

III- Rôle des acides aminés en tant que source d'azote ... 43

Résultats ... 44

IV- Rôle des vitamines ... 47

Résultats ... 49

Pages

Recherche de la concentration optimale en thiamine 51
Etude des fractions pyrimidique et thiazolique de la thiamine 54
Résultats et discussion 56

DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES SUR LES PROPRIETES ET LA NATURE CHIMIQUE DU PIGMENT 59

CHAPITRE I : Etude générale. 63

1. *Localisation du pigment* 63

2. *Essais d'extraction et instabilité du pigment* 71

a) action sur le mycélium frais 71
b) action sur le mycélium lyophilisé 72
c) action sur le mycélium séché à l'étuve 73

3. *Technique d'extraction du pigment brut* 74

4. *Facteurs de l'instabilité du pigment brut* 74

a) action de la lumière 74
b) phénomènes d'oxydo réduction 75
c) influence du pH 78

CHAPITRE II : Purification et étude du pigment 81

I- Purification 81

1) Chromatographie de l'extrait brut 81
2) Le composé cristallisé phénolique 83
3) Le pigment purifié 85

II- Etude du pigment purifié 86

1) Solubilité 86
2) Comportement chromatographique 86
3) Etude spectroscopique 87
4) Phénomènes d'oxydo réduction 90
5) Autres propriétés 93
6) Conclusions à ces études 94

CHAPITRE III : Parenté du pigment de *Corticium caeruleum* avec l'acide théléphorique. .....

Pages

I- Introduction bibliographique 95

II- Recherche de l'éther hexaméthylique de l'acide théléphorique 97

III- Etudes par spectrométrie de masse 100

A) *du pigment lui-même* 100
B) *du pigment acétylé* 105

IV- Discussion 106

CONCLUSIONS GENERALES 109

BIBLIOGRAPHIE 113

EDITIONS BERGERET 71/73,rue Leyteire 33000 BORDEAUX T.(56)91.12.59